

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação do Potencial Mutagênico, Antimutagênico e
Antioxidante do Óleo da Polpa de *Acrocomia aculeata*
(Arecaceae)

Autora: Gleicieli Libório de Alencar Costa
Orientadora: Prof. Dra. Susana Elisa Moreno
Co-orientadora: Prof. Dra. Simone Palma Favaro

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Março - 2012

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação do Potencial Mutagênico, Antimutagênico e
Antioxidante do Óleo da Polpa de *Acrocomia aculeata*
(Arecaceae)

Autora: Gleicieli Libório de Alencar Costa
Orientadora: Prof. Dra. Susana Elisa Moreno
Co-orientadora: Prof. Dra. Simone Palma Favaro

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à saúde”.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Março - 2012

“Nunca se dê por vencido. Desenvolvemos a sabedoria com os fracassos muito mais do que com os sucessos.”

Samuel Smiles

Aos
meus pais, Ivan e Damaris, que
foram o início de tudo

Ao
meu esposo, Odirley, que pacientemente me
incentivou dispensando de forma incondicional
todo apoio do qual precisei

À
minha filha, Ana Lara, que me alegrava nas horas
mais difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus, que me concedeu saúde e forças para superar os desafios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco por oportunizar-me a realização deste mestrado.

À professora Doutora Susana Elisa Moreno (minha orientadora), pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, pelo estímulo dispensado e, sobretudo, pelo acolhimento e amizade que sempre demonstrou.

À professora Doutora Simone Palma Favaro (co-orientadora), por conceder apoio laboratorial, fundamental na realização desse trabalho, e pelas orientações e ensinamentos dispensados.

À professora Doutora Ana Lucia Alves de Arruda, pela disponibilidade, sempre presente na condução desse trabalho, em especial na realização dos ensaios, o meu mais profundo reconhecimento.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelas disciplinas ministradas, fundamentais para minha formação.

Aos colegas Ana Paula Ferreira Leal, Brunna Mary Okubo, Danieli Fernanda Buccini, Frederico Nakasone Ferreira, Gabrielly Ciconini e Vinícius Varzim Cabistany, obrigado pelo acolhimento, pela companhia e amizade que cultivamos e pelo apoio e contribuição intelectual.

Aos responsáveis pelos laboratórios de Inflamação e Mutagênese e de Biotecnologia, por disponibilizarem a estrutura física e todo aparato de instrumentos e equipamentos necessários à realização dos experimentos e análises.

À Empresa Prata 1000 Indústria e Comércio Ltda, pelo apoio prestado, disponibilizando suas instalações e equipamentos, através de parceria com a UCDB.

À banca examinadora pelo intercâmbio de ideias, sugestões e discussões construtivas e enriquecedoras.

Enfim, expresso sinceros agradecimentos a todos aqueles que me acompanharam e que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente com seu saber científico e/ou dedicação pessoal para a concretização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

GLEICIELI LIBÓRIO DE ALENCAR COSTA, filha de Francisco Ivan Libório de Alencar e Damaris Francisca da Silva de Alencar, nasceu em Dourados, Mato Grosso do Sul, no dia 12 de abril de 1987.

Em dezembro de 2008, concluiu o curso de graduação em Farmácia pelo Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN.

Em março de 2010, concluiu o curso de especialização em farmacologia pela Universidade Católica Dom Bosco.

Em março de 2010, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, nível Mestrado, área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde, na Universidade Católica Dom Bosco, realizando estudos na área de mutagênese.

Em fevereiro de 2011, foi contratada pela empresa Sociedade Civil de Educação da Grande Dourados, onde exerce a função de supervisora de estágio em controle de qualidade, para o curso de farmácia, sendo também responsável pelo controle de qualidade da Farmácia-escola dessa instituição.

Em 2012 passou a exercer atividade docente no curso de graduação em farmácia da UNIGRAN.

No dia 15 de março de 2012, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
I - INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos Botânicos da <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd.	1
1.2. Usos e Potencialidades da Bocaiuva	3
1.3. Constituição Química e Aspectos Farmacológicos do Óleo de Bocaiuva ...	5
1.4. Genotoxicidade	7
1.4.1. Teste do Micronúcleo.....	7
1.5. Estresse Oxidativo & Danos ao DNA	10
1.5.1. Antioxidantes	13
1.6. Referências.....	15
II - OBJETIVOS GERAIS.....	20
III - EFEITO ANTIMUTAGÊNICO E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DA POLPA DA ACROCOMIA ACULEATA (JACQ.) LODD. EM MODELO MURINO	21
Resumo.....	22
Abstract.....	24
Introdução	26
Material e Métodos	27
Resultados	34
Discussão	41
Referências.....	45
ANEXO I.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Distribuição da <i>Acrocomia aculeata</i> no cerrado do Brasil.....	2
Figura 2 - Palmeiras, cachos e frutos da bocaiuva.....	3
Figura 3 - Fruto da bocaiuva.....	3
Figura 4 - Corpúsculos de Howell-Jolly.....	8
Figura 5 - Formação de micronúcleos.....	9
Figura 6 - A) Formação de um radical livre. B) Antioxidante neutralizando um radical livre.....	10
Figura 7 - Reação entre TBA e MDA, formando pigmento de coloração rósea.....	12
Figura 8 - Causas e consequências do estresse oxidativo ao DNA.....	13
 ARTIGO	
Figura 9 - Fluxograma de Obtenção do Óleo de Bocaiuva.....	27
Figura 10 - Curva de Calibração do MDA.....	32
Figura 11 - Avaliação do Efeito Mutagênico do Óleo de Bocaiuva Incorporado à Ração.....	35
Figura 12 - Efeito Antimutagênico do Óleo de Bocaiuva Incorporado à Ração.....	36
Figura 13 - Efeito Antimutagênico do Óleo de Bocaiuva Administrado por Gavagem.....	37
Figura 14 - Peroxidação Lipídica em Células de Animais Tratados com Óleo de Bocaiuva Administrado por Gavagem.....	38
Figura 15 - Peroxidação Lipídica em Células de Animais Alimentados com o Óleo de Bocaiuva Incorporado à Ração.....	39
Figura 16 - Reação de Formação do Complexo Hidroxilado de Salicilato.....	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Aproveitamento dos recursos advindos da <i>Acrocomia aculeata</i> , associados a distintas partes da planta.....	4
Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) na polpa <i>in natura</i> e amêndoa da bocaiuva, <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd., do estado de Mato Grosso do Sul.....	6
Tabela 3 - Teor de carotenoides e tocoferóis no óleo da polpa e da semente dos frutos da bocaiuva.....	14
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do óleo da polpa da bocaiuva.....	34
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos obtidos do óleo da polpa da bocaiuva.....	35
Tabela 6 - Atividade Antioxidante (%) em diferentes concentrações do padrão e do óleo obtida pelo método de varredura do radical hidroxila.....	40
Tabela 7 - Atividade Antioxidante (%) em diferentes concentrações do BHT e do óleo obtida pelo ensaio de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico após 60 min.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
LPO	Lipoperoxidação ou Peroxidação Lipídica
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleos
NCE	Eritrócitos Normocromáticos
PCE	Eritrócitos Policromáticos
RNA	Ácido Ribonucleico
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

RESUMO

A bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., é uma palmeira nativa do cerrado do Brasil, cujos frutos têm despertado grande interesse científico. O óleo da polpa da bocaiuva é rico em ácido oleico, possuindo também altas porcentagens de β -caroteno e α -tocoferol. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial mutagênico/antimutagênico e antioxidante do óleo extraído da polpa da bocaiuva. A polpa foi obtida de frutos coletados na região de Glória de Dourados, MS. O óleo foi extraído em extrator de Soxhlet com hexano, e o solvente removido por rotaevaporação (40°C). Para avaliação das características do óleo, determinou-se o índice de acidez, índice de peróxido, absorvidade molar, índice de iodo, perfil de ácidos graxos e carotenoides totais. Posteriormente, o óleo foi incorporado à ração de camundongos Swiss nas concentrações de 5, 10 e 20%, sendo investigado tanto o efeito mutagênico como antimutagênico, utilizando colchicina como substância indutora de mutações. A atividade antimutagênica do óleo foi também investigada em animais tratados por gavagem (50 μ l/dia durante dez dias). Amostras de soro dos ensaios de investigação antimutagênica foram submetidas à avaliação da peroxidação lipídica, pelo método do tiobarbitúrico (TBARS). A atividade antioxidante *in vitro* do óleo bruto foi avaliada pelo ensaio de atividade sequestradora de radicais hidroxila e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. Nos testes de caracterização, o óleo apresentou boa qualidade, destacando-se o percentual de ácido oleico (71,76%) e concentração de carotenoides totais (694 \pm 8,31 μ g/g). Os resultados com o óleo da *Acrocomia aculeata* evidenciaram ausência de atividade mutagênica e importante efeito protetor do óleo em inibir a formação de micronúcleos. A quantificação de malondialdeído (MDA) em amostras de soro de animais pré-tratados com o óleo evidenciou diminuição nos níveis de lipoperoxidação em todas as concentrações testadas. Em baixas concentrações (5 μ g/ml), o óleo apresentou alta atividade antioxidante (aproximadamente 70%), em ambos os métodos testados. Estes dados sugerem que o óleo da polpa de bocaiuva tem alto potencial nutracêutico, com atividade antioxidante e quimiopreventiva.

Palavras-chaves: ácidos graxos monoinsaturados, betacaroteno, genotoxicidade, peroxidação lipídica, radicais livres, teste de micronúcleos.

ABSTRACT

The bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., is a native palm found in Brazilian Cerrado, which fruits have aroused great scientific interest. The bocaiuva pulp oil is rich in oleic acid and also detected high content of β -carotene and α -tocopherol. The aim of this study was to evaluate the mutagenic/antimutagenic and antioxidant potential of the oil extracted from the bocaiuva pulp. The pulp was obtained from fruits collected in the region of Glória de Dourados, state of Mato Grosso do Sul. The oil was extracted by Soxhlet method using hexane, and the solvent was removed by rotary evaporation (40 °C). The value of the acid, peroxide, iodine, the molar absorptivity, fatty acid profile and total carotenoids were measured to analyze the characteristics of the oil. Subsequently, the oil was incorporated into the diet of swiss mice at concentrations of 5, 10 and 20%, being analyzed both mutagenic and antimutagenic effects, using colchicine as the substance to induce mutation. The antimutagenic activity of the oil was also investigated in mice treated by gavage (50 μ l/ day for 10 days). Serum samples of antimutagenicity test were subjected to the evaluation of lipid peroxidation by TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) assay. The *in vitro* antioxidant activity of the oil was assessed by hydroxyl radical scavenging activity assay and the β -carotene/linoleic acid system. In the characterization tests, the oil showed good quality, especially the percentage of oleic acid (71.76%) and total carotenoid concentration (694 \pm 8,31 μ g/g). The results with the oil of *Acrocomia aculeata* showed no mutagenic activity and significant protective effect of the oil, inhibiting the formation of micronuclei. The quantification of malondialdehyde (MDA) in serum samples from animals pre-treated with oil showed a decrease in the levels of lipid peroxidation at all concentrations tested. At low concentrations (5 μ g/ml), the oil showed strong antioxidant activity (approximately 70%), in both methods tested. These data suggest that the bocaiuva pulp oil possesses high nutraceutical potential, with antioxidant and chemopreventive activities.

Keywords: beta-carotene, free radicals, genotoxicity, lipid peroxidation, micronucleus test, monounsaturated fatty acids.

INTRODUÇÃO

A utilização de extratos e óleos vegetais ou qualquer composto orgânico com finalidade terapêutica ou alimentícia deve ser precedida por estudos de avaliação toxicológica, pois podem conter substâncias com potencial mutagênico e/ou carcinogênico. Por outro lado, diversas plantas possuem em sua composição substâncias capazes de inibir a ação de agentes mutagênicos, exercendo atividade antimutagênica, contudo, os mecanismos responsáveis por essa atividade ainda encontram-se obscuros. Desta forma, dentre as avaliações toxicológicas, a avaliação dos efeitos mutagênicos é tida como obrigatória, pois visa fundamentar o emprego racional e seguro de substâncias, tanto para o ambiente como para os seres vivos (De Marini, 1998; Paoline e Nestlé, 2003).

1.1. Aspectos Botânicos da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.

A bocaiuva, nome popular da palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., é uma espécie nativa das florestas tropicais. Pertence ao gênero *Acrocomia* da família Arecaceae, o qual é composto por duas espécies – *A. aculeata* Jacq. Lodd. ex Mart. e *A. totai* Mart., que diferem basicamente quanto ao tamanho, sendo a primeira de maior porte variando de 10-15 m (Lorenzi *et al.*, 1996). O termo *Acrocomia* deriva do grego “Akron” (uma) e “Kome” (cabeleira) sugerindo que as folhas estão dispostas no formato de uma coroa (Henderson *et al.*, 1995).

Considerada a palmeira de maior dispersão no Brasil, a espécie *A. aculeata* possui povoamentos naturais em quase todo território nacional, como ilustrado na Figura 1. Suas maiores concentrações estão localizadas em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente dispersas em áreas de Cerrado. No Brasil, essa palmeira é conhecida por diferentes nomes: bocaiuva, chiclete-de-baiano, coco-baboso, coco-de-espinho, macacaua, macaiba,

macaibeira, macajuba, macaúba, macaúva, mucaia, mucaja e mucajaba (Henderson *et al.*, 1995).

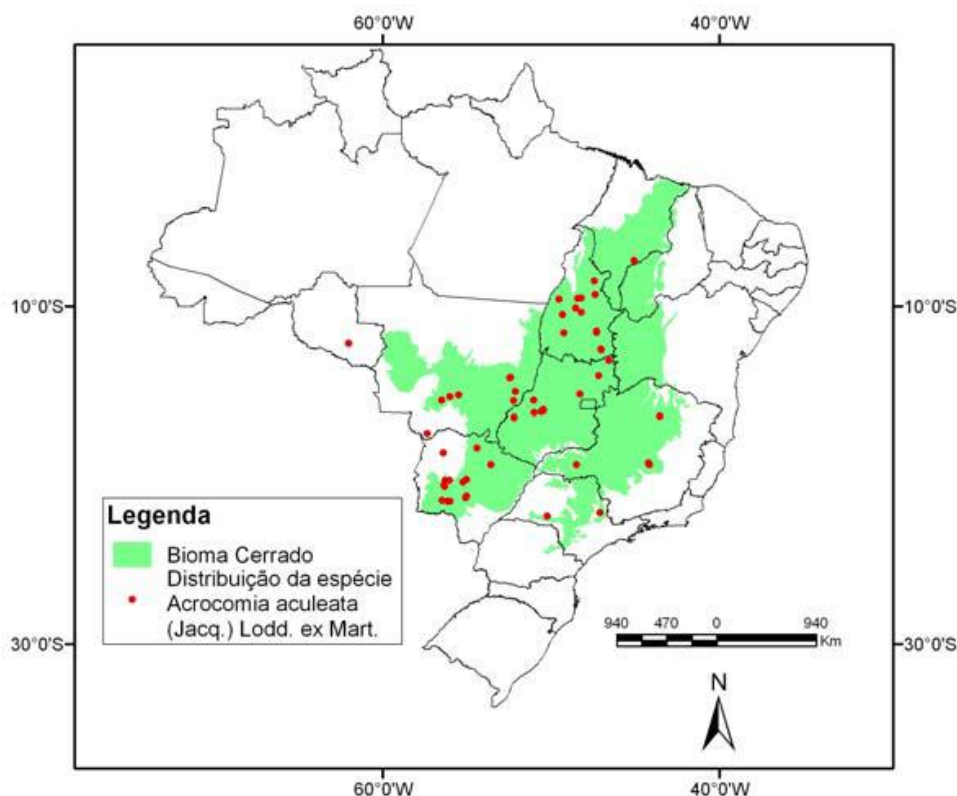


Figura 1 – Distribuição da *Acrocomia aculeata* no cerrado do Brasil (Ratter *et al.*, 2003).

Essa palmeira, conforme ilustrado na Figura 2, possui um estipe que pode atingir até 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro. A região dos nós é coberta de espinhos escuros, pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento. Frequentemente, o estipe é coberto pelas bases dos pecíolos, que permanecem aderidas a este por muitos anos. As folhas verdes, ordenadas em diferentes planos, são pinadas com comprimento variando de 4 a 5 m, apresentando aproximadamente 130 folíolos de cada lado e espinhos na região central. Entre as folhas destacam-se a espata de até 2 m comprimento, as inflorescências amarelas e os cachos de frutos de tom marrom-amarelado quando maduros (Bondar, 1964; Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi *et al.*, 1996; Gray, 2005; Missouri, 2005).

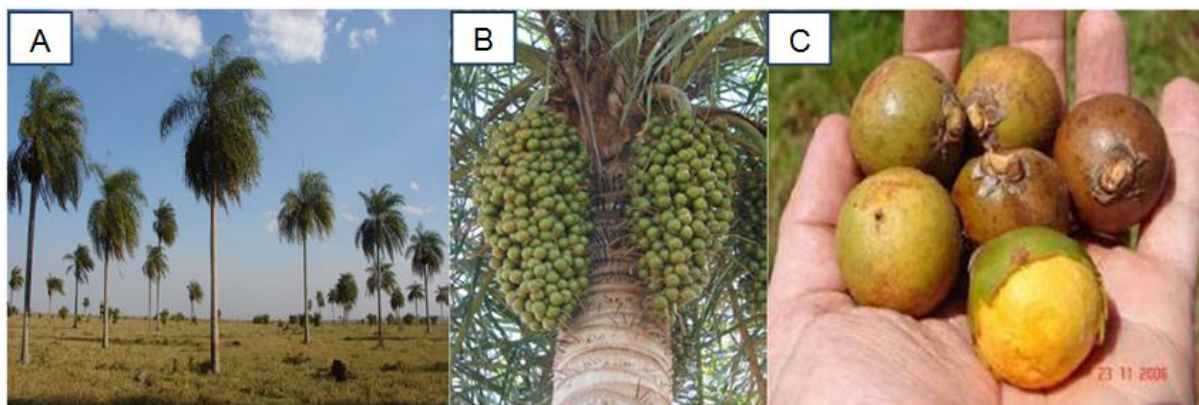


Figura 2 – A) Palmeiras; B) Cachos e C) Frutos da bocaiuva (adaptado de CETEC, 1983).

Os frutos (Figura 3) são esféricos ou ligeiramente achatados, com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm. O epicarpo rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo é fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado e comestível. O endocarpo é fortemente aderido à polpa (mesocarpo), com parede enegrecida e a amêndoa oleaginosa, comestível e revestida de uma fina camada de tegumento (Lorenzi *et al.*, 1996, Teixeira, 1996; Miranda *et al.*, 2001).

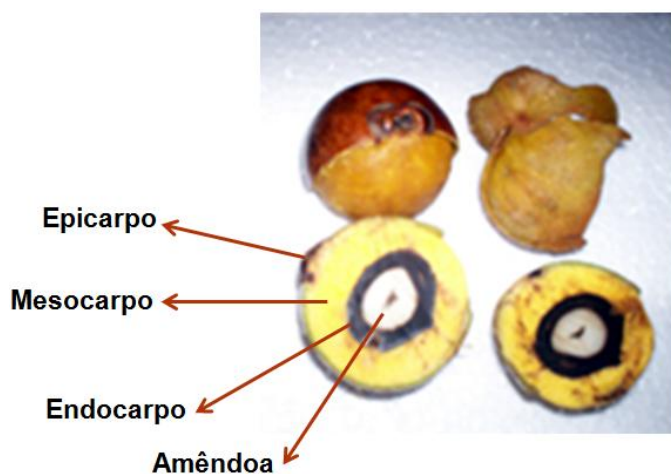


Figura 3 – Fruto da bocaiuva.

1.2. Usos e Potencialidades da Bocaiuva

A *Acrocomia aculeata* apresenta diversas formas de aproveitamento. Lorenzi (2006) aponta diferentes categorias de uso associadas às distintas partes do corpo vegetal dessa palmeira, como verificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Aproveitamento dos recursos advindos da *Acrocomia aculeata*, associados a distintas partes da planta (*adaptado de Lorenzi, 2006*).

Parte da planta	Uso	Finalidades
Plântulas (parte aérea)	Medicinal	diurético, hipotensor
Raízes	Medicinal	Diurético
Estipe	Estipe	caibro, ripas, calhas, mourão, estacas
Estipe (medula)	Alimento	fécula nutritiva
Estipe (meristema apical)	Alimento	Palmito
Estipe (seiva)	Alimento	Vinho
Estipe (seiva)	Medicinal	Febrífuga
Folha	Forragem	gado bovino, equino, ração animal
Folha	Fibra	chapéu, balaio, linha de pesca, redes
Folha	Outro	cobertura de casas
Fruto (mesocarpo)	Medicinal	Fortificante
Fruto (mesocarpo)	Alimento	fruta, goma de mascar, paçoca, geleia e cocada
Fruto (óleo do mesocarpo)	Alimento	licor, sorvete
Fruto (óleo do mesocarpo)	Medicinal	analgésico (dor de cabeça e nevralgias)
Fruto (óleo do mesocarpo)	Cosmético	hidratante capilar
Semente	Outro	substitui a brita no concreto
Semente	Artesanato	confeção de botões
Semente (amêndoa)	Alimento	coco, paçoca
Semente (óleo da amêndoa)	Alimento	óleo de cozinha
Semente (óleo da amêndoa)	Combustível	lamparina, produção de energia
Semente (óleo da amêndoa)	Cosmético	hidratante capilar
Semente (óleo da amêndoa)	Medicinal	Laxante

Dessa planta, todo o fruto pode ser aproveitado – casca, polpa, castanha e amêndoa – e tanto a polpa quanto a amêndoa têm vasta utilização. A polpa e a farinha de bocaiuva possuem grande mercado potencial, inclusive para outros estados do Brasil, podendo ser usadas em vitaminas, fabricação do sorvete, bolos e pães, agregando maior valor nutritivo à merenda escolar, pois são também produtos ricos em cálcio e potássio (Salis e Juracy, 2005).

No contexto brasileiro, a *Acrocomia aculeata* apresenta perspectivas de grande importância econômica, dada a possibilidade de seus frutos fornecerem 20 a 30% de óleo, 5% de farinha comestível, 35% de tortas forrageiras e 35% de combustível de alto poder calórico (Silva, 1994). Frente à necessidade atual de fontes alternativas de energia, a bocaiuva é considerada uma das espécies nativas com alta potencialidade de fornecimento de óleo para a produção de biodiesel (Roscoe *et al.*, 2007).

As nozes (amêndoas) da bocaiuva também apresentam elevado teor de proteínas, assim, tratando-se de um recurso alimentar natural, a espécie *Acrocomia aculeata* mostra ser uma alternativa agrícola que pode atender e/ou suplementar

satisfatoriamente dietas nutricionalmente deficientes em proteínas, vitaminas e minerais (Hiane *et al.*, 1992; Togashi e Sgarbieri, 1995; Vieira e Bion, 1998; Souza e Menezes, 2004).

1.3. Constituição Química e Aspectos Farmacológicos do Óleo de Bocauiuva

Considerando que a composição química de uma matéria-prima é fator primordial para sua qualidade nutricional, o fruto da bocauiuva vem apresentando crescente interesse industrial, já que se pode explorar tanto a polpa como a amêndoa. As amêndoas apresentam alto teor de lipídios (51,7%), proteínas (17,6%) e fibras (15,8%). A polpa contém em média 49% de umidade, 1,7% de minerais totais, 17% de lipídeos, 2% de proteínas e 31% de carboidratos totais (Hiane *et al.*, 1990; Hiane *et al.*, 2006).

Quanto ao potencial nutritivo dos frutos da bocauiuva, destaca-se a alta porcentagem de β -caroteno presente na polpa (Ramos *et al.*, 2008). Os carotenoides presentes nas hortaliças e frutas atuam não apenas como corantes naturais, mas como compostos bioativos com atuação benéfica à saúde humana. A principal atividade é atribuída à capacidade de conversão em vitamina A, que no organismo está relacionada à visão, ao crescimento ósseo e à diferenciação de tecidos (Olson, 1999; Iom, 2001). Atuam também na redução de risco de patologias como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, desordens fotossensíveis e do sistema imunológico (Sommer, 1995; Paho, 2001; Tapiero *et al.*, 2004).

Estudos apontam a importância de se conhecer a biodisponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos, a qual pode ser afetada por muitos fatores endógenos ou exógenos. Um estudo sobre a biodisponibilidade do β -caroteno presente na polpa da bocauiuva revelou que este é altamente biodisponível em relação ao β -caroteno puro, o que evidencia o potencial da polpa da bocauiuva como alimento nutritivo (Ramos *et al.*, 2008).

O perfil de ácidos graxos do óleo da polpa da bocauiuva é composto majoritariamente de monoinsaturados, sendo constituído de aproximadamente 73% de ácido oleico, além de 16% de palmítico, que é um ácido graxo saturado (Hiane *et al.*, 1990). Na Tabela 2 está apresentada a composição em ácidos graxos do fruto da bocauiuva.

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) na polpa *in natura* e amêndoa da bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., do estado de Mato Grosso do Sul.

Ácidos Graxos	Polpa	Amêndoa
Ácido Caprílico (C ₈)	0,45	5,96
Ácido Cáprico (C ₁₀)	0,27	1,79
Ácido Láurico (C ₁₂)	1,97	12,95
Ácido Mirístico (C ₁₄)	0,45	9,49
Ácido Palmítico (C ₁₆)	15,96	12,62
Ácido Palmitoleico (C _{16:1})	1,01	2,29
Ácido Esteárico (C ₁₈)	5,92	6,58
Ácido Oleico (C _{18:1})	65,87	40,17
Ácido Linoleico (C _{18:2})	5,10	5,91
Ácido Linolênico (C _{18:3})	2,52	1,92
Ácido Araquídico (C ₂₀)	0,50	0,30
Ácidos Saturados	25,52	49,69
Ácidos Monoinsaturados	66,88	42,46
Ácidos Poliinsaturados	7,62	7,83

Fonte: Hiane *et al.* (2005)

O ácido oleico é um exemplo de ácido graxo, o ômega 9 (AGn-9), e está presente em altas concentrações no azeite de oliva e de canola. Alguns estudos apontam que este ácido graxo protege contra o desenvolvimento de doença coronariana aterosclerótica, já que os monoinsaturados atuam na diminuição do colesterol total, aumento do HDL, inibição de agregação plaquetária e como trombolítico. Uma dieta rica em ácidos graxos monoinsaturados previne a modificação oxidativa das lipoproteínas de modo mais significativo que uma dieta rica em poliinsaturados (Longo, 2001).

Substâncias do grupo dos ácidos graxos mono ou poliinsaturados possuem importância diversificada ao organismo, apresentando atividade antiinflamatória por inibirem a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como as prostaglandinas, além de ação moduladora do sistema imunológico, contribuindo para a capacidade de circunscrição de infecções pelo hospedeiro e limitando a resposta inflamatória (Grandjean, 2003).

Um grande número de compostos antimutagênicos e anticarcinogênicos, têm sido identificado em estudos laboratoriais com plantas (De Marini, 1998). Atualmente, no campo das investigações farmacológicas, há uma tendência geral de investigar o efeito genotóxico, carcinogênico ou teratogênico das plantas utilizadas para fins medicinais, sendo essa avaliação fundamental para o emprego racional e seguro dessas plantas (Sánchez-Lamar, 1999).

1.4. Genotoxicidade

A genotoxicidade diz respeito à capacidade que possui uma determinada substância em induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos, cujas alterações são responsáveis pelo surgimento de cânceres e doenças hereditárias. Os agentes que provocam mudanças na sequência do DNA são “tóxicos” para o gene, sendo, portanto, chamados de “genotóxicos” (Ribeiro, 2003).

Efeitos genotóxicos são passíveis de ocorrer até mesmo frente a concentrações muito baixas de substâncias. Se as lesões ao DNA não forem reparadas, elas podem desencadear uma série de consequências biológicas em cadeia, afetando as células, órgãos, organismos e finalmente as populações e comunidades (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Mitchelmore e Chipman, 1998; Lee e Steinert, 2003).

Os primeiros testes rápidos e eficientes para monitoramento de genotoxicidade foram descritos há mais de 50 anos (Villela *et al.*, 2003). Dentre os principais testes destacam-se: avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, o método de trocas entre cromátides irmãs, ensaio cometa, medição da frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares (Bombail, 2001). Esses testes são indicadores biológicos que avaliam mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA.

1.4.1. Teste do Micronúcleo

O ensaio *in vivo* do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea de mamíferos roedores é amplamente aceito e recomendado para avaliação e registro de novos compostos químicos e farmacêuticos inseridos no mercado mundial. O ensaio, quando realizado de forma adequada, detecta agentes clastogênicos (que induzem a quebra de cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou disfunção do fuso mitótico) (Choy, 2001, Ribeiro *et al.*, 2003).

Os micronúcleos, também conhecidos como corpúsculo de Howell-Jolly (Figura 4), são cromossomos inteiros ou parciais não incorporados ao núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem no citoplasma como uma pequena

estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular (Heddle, 1973; Schmid, 1975).

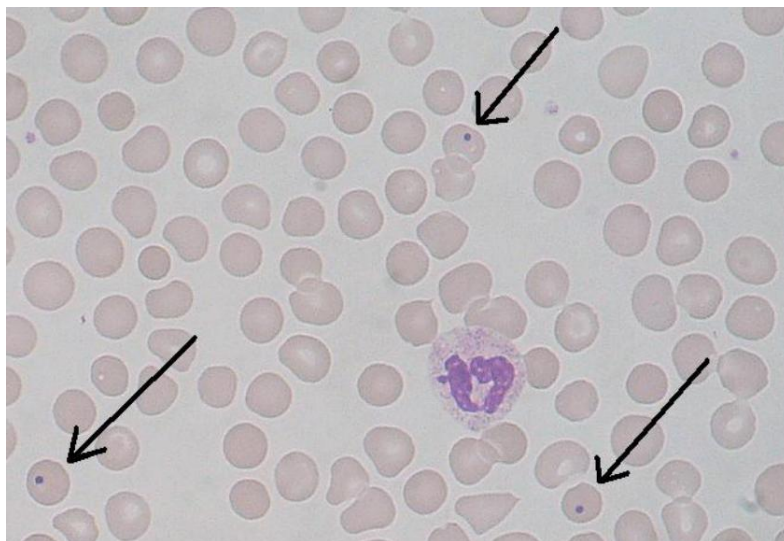


Figura 4 – Corpúsculos de Howell-Jolly (Fonte: Wikipédia).

Os micronúcleos se formam pela extrusão de cromossomos inteiros ou seus fragmentos durante a divisão celular, sendo que o princípio do teste está baseado no fato de que, durante a anáfase, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômeros são. Após a telófase, os cromossomos sem danos são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. Elementos que não foram transportados pelo fuso também podem ser englobados pelos núcleos recém-formados. No entanto, alguns destes elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos núcleos recém-formados e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como MN (Schmid, 1975), conforme demonstra a Figura 5.

Fenech (1998) relata que o aspecto mais importante do teste do micronúcleo é que ele possibilita identificar eventual aumento na frequência de mutação em células que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos, expressando os danos no cromossomo como micronúcleos. Apresenta também como vantagem baixo custo para sua realização e rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias (Garaj-Vrhovac; Zeljezic, 2001).

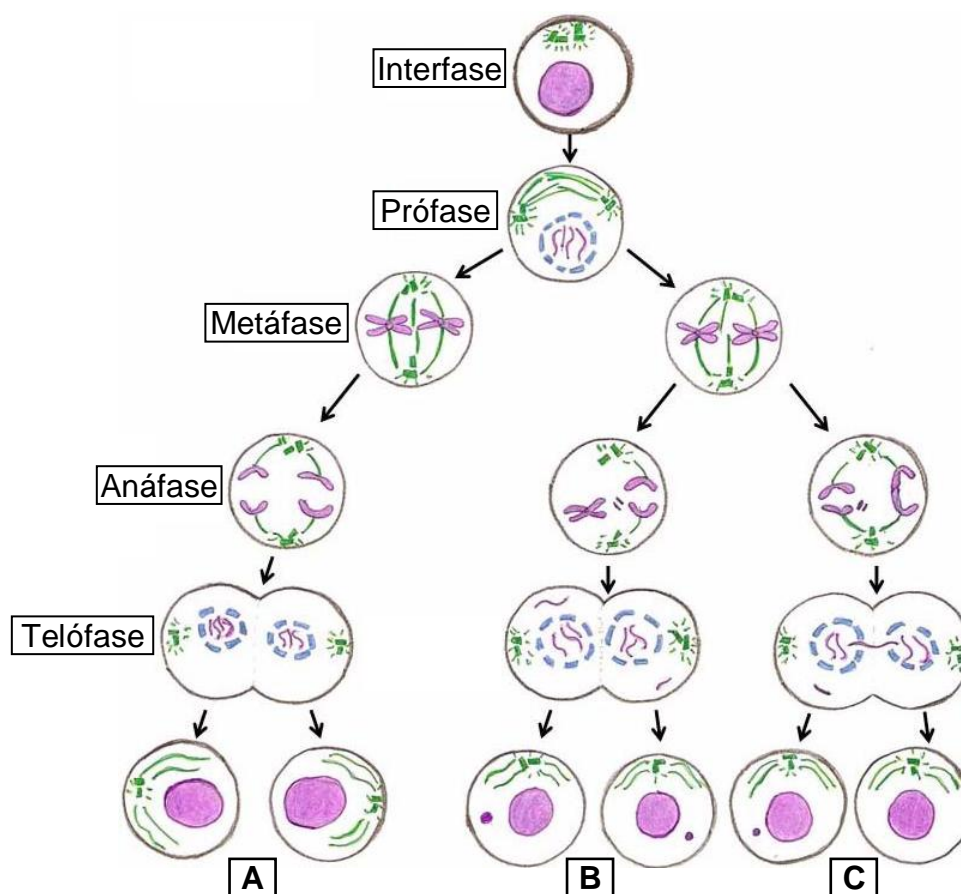


Figura 5 – Formação de micronúcleos. A) processo normal de divisão celular. B) formação do MN por fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro, por não terem sido incluídos no núcleo recém-formado e permanecerem no citoplasma após a fase da telófase; C) formação do MN por ponte citoplasmática com fragmento cromossômico acêntrico que não foi incluído no núcleo recém-formado, permanecendo no citoplasma após a telófase (adaptado de Sponchiado, 2008).

Segundo o procedimento original, os micronúcleos são contados principalmente nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo para formar os eritrócitos no processo de eritropoiese, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis (Heddle, 1973; Schmid, 1975). Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em animais expostos a produtos teste indica danos cromossômicos. Os eritrócitos policromáticos (PCE) com o tempo perdem RNA e acumulam hemoglobina, evoluindo para eritrócitos normocromáticos (NCE), que são os eritrócitos maduros que chegam à corrente sanguínea (Krishna e Hayashi, 2000).

Na realização desse teste, o sangue pode substituir a medula óssea e os eritrócitos maduros (NCE) são considerados para a avaliação da presença de micronúcleos. Segundo Hayashi (1994), a análise em sangue periférico tem muitas vantagens sobre a análise em medula óssea, pois é tecnicamente mais simples, a contagem é mais objetiva e a leitura pode ser feita por automação em menor tempo de ensaio.

1.5. Estresse Oxidativo & Danos ao DNA

O estresse oxidativo ocorre pelo desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta da indução de danos celulares pelos radicais livres, podendo causar danos a todos os tipos de moléculas biológicas, incluindo o DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (Sies, 1993).

Esses radicais livres (RL) são moléculas instáveis, altamente reativas, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo sua formação determinada pela perda ou ganho de um elétron ou hidrogênio, ficando com um elétron desemparelhado, conforme ilustrado na Figura 6. O excesso desses radicais no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo próprio corpo ou absorvidos da dieta (Ferreira; Matsubara, 1997).

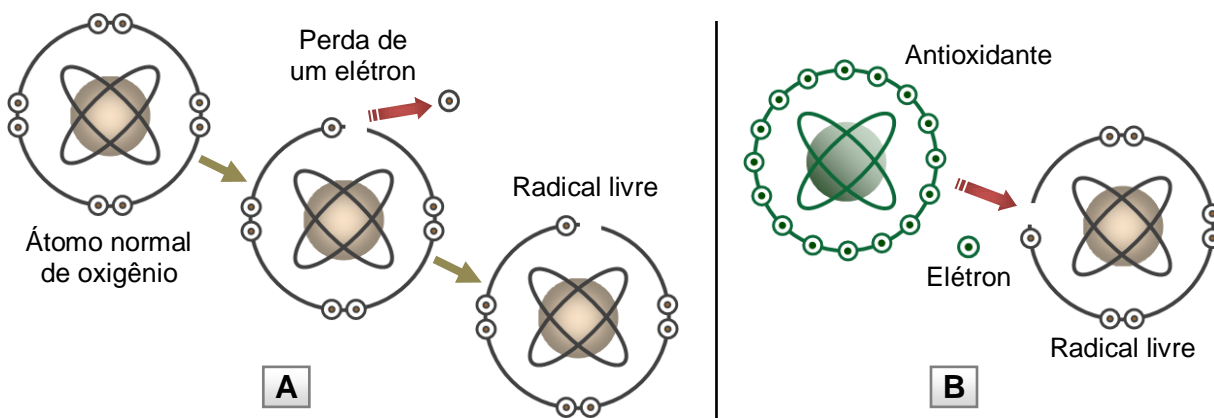


Figura 6 – A) Formação de um radical livre. B) Antioxidante neutralizando um radical livre.

As reações dos processos metabólicos, muitas vezes, geram as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo este termo utilizado para designar os radicais livres derivados do oxigênio molecular. As ERO podem ser classificadas em dois

grupos: os radicalares e os não radicalares. Entre os radicalares podemos citar o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (HO^{\cdot}), radical peroxila (RO_2^{\cdot}) e o radical alcóxila (RO^{\cdot}), e entre os não-radicalares o oxigênio singlete, o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso. Além das EROs, existem as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que incluem o óxido nítrico (NO^{\cdot}), ácido nitroso (HNO_2), óxido nitroso (N_2O_3), nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) e peroxinitritos ($ONOO^{\cdot}$). Dentre as espécies radicalares, o radical hidroxila é um dos mais potentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas tais como os lipídeos e o DNA. Já das espécies não-radicalares, o oxigênio singlete (O_2) é considerado a forma mais deletéria do oxigênio ao organismo, sendo a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 em organismos vivos (Ferreira; Matsubara, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006).

Como relata Bulger e Helton (1998), deve-se levar em consideração que o estresse oxidativo é necessário no nosso organismo, já que nos processos inflamatórios, na defesa frente às infecções são formados radicais livres a fim de destruir agentes patogênicos. Mas, em determinadas circunstâncias, as defesas antioxidativas do organismo não conseguem evitar o dano oxidativo que atinge os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

A oxidação da camada lipídica da membrana celular, conhecida como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), consiste num dos principais mecanismos de lesão quando ocorre o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, provocando diversas alterações na função celular, e pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares (Schenider; Oliveira, 2004).

A LPO acarreta alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares gerando, por consequência, perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, além de causar a formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído (MDA), que pode ser utilizado como indicador da ação dos radicais livres no organismo (Mello *et al.*, 1983).

Vários modelos experimentais são utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de determinada substância, por meio de diferentes mecanismos que podem, por sua vez e resguardadas as suas limitações, serem extrapolados para o

meio biológico. Não existe um único ensaio que possa avaliar a capacidade oxidante total de uma determinada amostra (Prior *et al.*, 2005).

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lipídios consiste no teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), introduzido por Kohn e Liversedge (1944). Esse é um teste simples e rápido, porém inespecífico. O teste consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e temperatura elevada, conforme demonstrado na Figura 7 (Yu *et al.*, 1986).

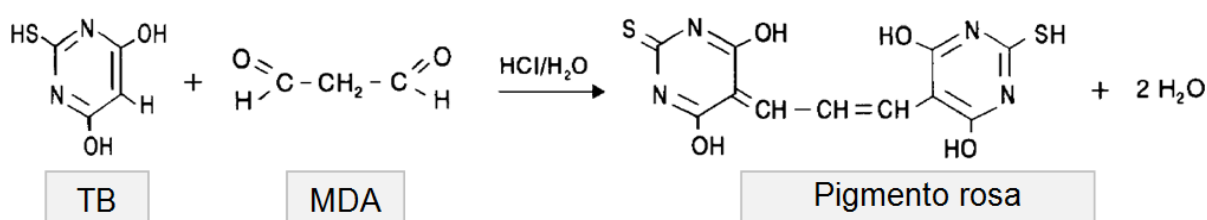


Figura 7 - Reação entre TBA e MDA, formando pigmento de coloração rósea (Fernandez, 1997).

O MDA é considerado um iniciador carcinogênico e mutagênico (Fernandez, 1997). Assim, a LPO pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Hershko, 1989).

Segundo Trueba *et al.* (2004), dano oxidativo ao DNA é considerado o fator mais importante na carcinogênese. Evidências sugerem um importante papel de ROS na expansão e progressão de clones de tumor, sendo considerada relevante classe de substâncias cancerígenas.

Há vários motivos para associar o estresse oxidativo com o câncer. Hoje, já se sabe que a lesão no DNA induzida pelo radical hidroxila inclui alterações de bases e quebra da molécula. Danos oxidativos ao DNA podem causar erros de transcrição, erros de replicação, e instabilidade genômica, que são todos associados com a carcinogênese (Figura 8) (Cooke; Evans, 2005).

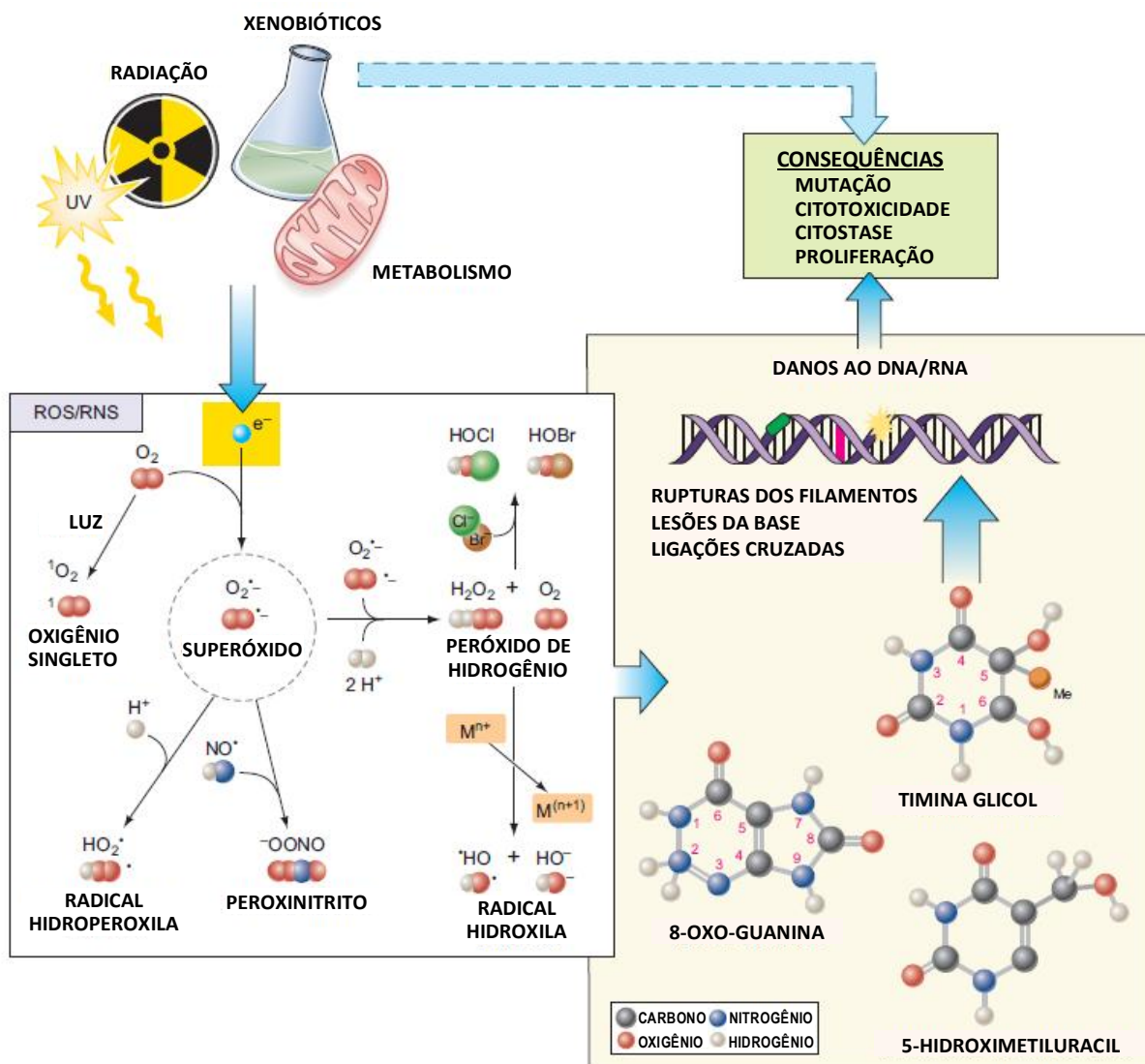


Figura 8 – Causas e consequências do estresse oxidativo ao DNA. As ERO e ERN podem resultar de processos comuns, endógenos ou exógenos. Os elétrons livres produzidos por estes processos são capturados pelo oxigênio molecular, produzindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Interações adicionais permitem a produção de outras espécies reativas, incluindo os radicais altamente reativos hidroxila (HO^{\cdot}). Interação destas espécies reativas com os ácidos nucleicos pode conduzir a uma grande variedade de alterações nas bases, podendo causar quebras na fita de DNA e ligações cruzadas. As consequências de danos não reparados ao DNA, potencialmente incluem mutações que eventualmente levam à neoplasia (adaptado de Cooke e Evans, 2005).

1.5.1. Antioxidantes

Os antioxidantes auxiliam na redução das reações que conduzem à produção os radicais livres (Bachur *et al.*, 2007). O termo antioxidante pode ser definido como

uma família heterogênea de moléculas naturais, que, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (Oliveira *et al.*, 2009).

As células e tecidos utilizam um exaustivo estaleiro de enzimas protetoras citoplasmáticas e mitocondriais, conhecidas como antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, glutatíon peroxidase, a catalase), considerados como linha de frente da defesa antioxidante e os antioxidantes não enzimáticos como a vitamina C, vitamina E, coenzima Q e betacarotenos (García; Rejanne, 2002).

Os antioxidantes possuem elevada estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular e por isso desempenham papel fundamental na prevenção à oxidação de substâncias (AUST *et al.*, 2001).

Os óleos vegetais apresentam uma grande variedade de antioxidantes naturais tais como os tocóis (α -, β -, γ - e δ -tocoferol e tocotrienol), os compostos fenólicos, os esteróis e os carotenoides (Huang e Prior, 2005). Vários estudos relatam que os óleos vegetais apresentam potencial efeito na prevenção de doenças crônicas, sendo capazes de proteger sistemas biológicos contra a ação das espécies reativas de oxigênio, responsáveis por danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (Ramadan *et al.*, 2006).

Estudos enfatizam o alto teor de β -caroteno da polpa de bocaiuva, que tem se mostrado superior ao encontrado em outros frutos do cerrado do pantanal sul-mato-grossense (Ramos *et al.*, 2008). Além dos carotenoides, Coimbra e Jorge (2011) relataram altos teores de tocoferol no óleo da polpa da bocaiuva (Tabela 3), os quais também apresentam atividade antioxidante e representam uma importante fonte de vitamina E. Nos óleos vegetais, os tocoferóis atuam protegendo os ácidos graxos insaturados da oxidação lipídica.

Tabela 3 – Teor de carotenoides e tocoferóis no óleo da polpa e da semente dos frutos da bocaiuva (Coimbra e Jorge, 2011).

Presença	Polpa	Semente
Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$)	$300,01 \pm 2,29$	$1,82 \pm 0,04$
Tocoferóis totais (mg/kg)	$212,95 \pm 0,64$	$23,10 \pm 0,01$
α -tocoferol (mg/kg)	$143,70 \pm 1,13$	$14,35 \pm 0,07$
β -tocoferol (mg/kg)	$3,25 \pm 0,21$	$0,85 \pm 0,07$
γ -tocoferol (mg/kg)	$57,85 \pm 0,35$	Nd
δ -tocoferol (mg/kg)	$8,15 \pm 0,07$	$7,90 \pm 0,00$

A presença de substâncias antioxidantes nos vegetais atribui-se ao processo evolutivo destas espécies como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação UV necessária à fotossíntese. Assim, os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais, sendo a maioria de seus efeitos biologicamente ativos derivados de suas funções antioxidantes (Scotti *et al.*, 2007).

1.6. Referências

- AL-SABTI, K.; Metcalfe C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v.343, n.2-3, p.121-135, 1995.
- AUST, O. *et al.* Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J. Chromatogr.*, v.936, n.1, p.83-93, 2001.
- BACHUR, J. A. *et al.* Anti-oxidative systems in rat skeletal muscle after acute physical exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*, v.32, n.2, p.190-196, 2007.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*, v. 29, n. 1, 2006.
- BONDAR, G. Palmeiras do Brasil. São Paulo: Instituto de Botânica, n.2, p.50-554, São Paulo, 1964.
- BOMBAIL, V. *et al.* Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, v.44, n.3, p.383-392, 2001.
- BULGER, E. M.; HELTON, W. S. Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterol Clin North Am.*, v.27, n.2, p.403-419, 1998.
- CETEC - Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais. CETEC: Belo Horizonte-MG, 1983.
- CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. In. CHOY, W. N., editor. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001. p.93-113.
- COOK, M. S.; EVANS, M. D. Reactive Oxygen Species: From DNA Damage to Disease. *Science & Medicine*, v.10, n.2, p.98-110, 2005.
- COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm

fruits. Department of Food Engineering and Technology, São Paulo State University, São José do Rio Preto, Brazil, 2011.

DE MARINI, D. M. Dietary interventions of human carcinogenesis. *Mutat Res*, v.400, p.457-465, 1998.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutation Research*, v. 404, n.1-2, p. 155-165, 1998.

FERNANDEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNANDEZ-LOPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, v.59, n.3, p.345-353, 1997.

FERREIRA. A. L. A; MATSUBARA. L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista ASS MED Brasil*. v.43, n.1, 1997.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *J Appl Toxicol.*, v.22, n.4, p.249-255, 2002.

GARCÍA, J. A. V.; DAOUD, R. Efeitos dos antioxidantes fenólicos na prática desportiva. *Fitness & Performance Journal*, v.1, n.4, p.21-27, 2002.

GRANDJEAN, D. Tudo o que deve saber sobre estes nutrientes que alimentam previnem e curam cães e gatos. Paris: Royal Canin, 2003. 80p. (Boletim Técnico, 80).

GRAY, M. Palm and Cycad Societies of Australia. Disponível em: <<http://www.pacsoa.org.au/palms/Acrocomia/aculeata.html>> Acesso em: 20 set. 2005.

HAYASHI, M. *et al.* *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*. v.312, n.3, p.293-304, 1994.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research*. v.18, n.2, p.187-190, 1973.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. Field Guide to the Palms of the Americas. New Jersey: Princeton University, p.166-167, 1995.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol*, v.26. p.277-285, 1989.

HIANE PA, *et al.* Bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Braz J Food Technol*, v.8, n.3, p.256-259, 2005.

HIANE, P. A. *et al.* Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ciênc. Tecnol. Aliment., v.26, n.3, 2006.

HIANE, P. A. *et al.* Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do Estado de Mato Grosso do Sul. Boletim do CEPPA, v.10, n.1, p.35-42, 1992.

HIANE, P. A.; PENTEADO, M.D.V.C. Carotenoides e valores de vitamina A do fruto e da farinha de bocaiuva (*Acrocomia mokayáya* Barb. Rodr.) do Estado de Mato Grosso do Sul. Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, São Paulo, v.25, n.2, p.158-168, 1990.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric Food Chem., v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, epinephrine and menadione. J. Pharmacol., v.82, p.292-297, 1944.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research, v.455, n.1-2, p.155-166, 2000.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/Comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research, v.544, n.1, p.43-64, 2003.

LONGO, S. *et al.* Ácidos graxos n-3, n-6 e prevenção de doenças vasculares. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.77, n.1, p.287-310, 2001.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LORENZI, H. *et al.* Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1996. p.1-20.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochem J., v.218, n.1, p.273-275, 1984.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Acrocomia aculeata*. Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em: 16 out. 2005.

MIRANDA, I. P. A. *et al.* Frutos de Palmeiras da Amazônia. Manaus-AM: Creative, v.1, p.120, 2001.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential values of the comet assay in environmental monitoring. Mutation Research, v.399, n.2, p.135-147, 1998.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Química Nova, v.32, n.3, p.689-692, 2009.

PAOLINI, M.; NESTLE, M. Pitfalls of enzymes-based molecular anticancer dietary manipulations: food for thought. Mutation Research, v.543, p.181-189, 2003.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

RAMADAN, M. F.; MOERSEL, J. T. Screening of the antiradical action of vegetable oils. Journal of Food Composition and Analysis. v.19, p.838-842, 2006.

RAMOS, M. I. L. *et al.* Qualidade nutricional da polpa de bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.28, p.90-94, 2008.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. Edinburgh Journal of Botany. v.60, n.1, p.57-109, 2003.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: ed. ULBRA, 2003. 356 p.

ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHO, E. Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. Revista Política Agrícola, n.1, p.48-59, 2007.

SALIS, S. M.; JUARACY, A. R. M. A Utilização da bocaiuva no Pantanal. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM081.pdf>> Acesso em: 16 dez. 2009.

SÁNCHEZ-LAMAR, Á.; FLORES, M. Genotoxicidad de *Phyllanthus orbicularis* evaluada el ensayo de micronúcleos em células de ovario de hámster chino. Rev Cubana Invest Biomed, v. 18, p. 22-23, 1999.

SCHNEIDER, C. D; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismo de formação e adaptação ao treinamento. Rev. Bras Med Esporte, v.10, n.4, p.308-309, 2004.

SCHMID, W. The micronuclei test. Mutation Research. v.31, p.9-15, 1975.

SCOTTI, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.43, n.2, p.153-166, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: review. Eur. J. Biochem., v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVA, J. C. Macauba: fonte de matéria prima para os setores alimentício, energético e industrial. Viçosa: CEDAF/DEF/UFV, 1994. 41 p.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetro de qualidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.1, p. 120- 128, 2004.

SPONCHIADO, G. Avaliação ecotoxicológica de 17 β -estradiol por meio de parâmetros genéticos utilizando como modelo experimental *Oreochromis niloticus*. Dissertação - Mestrado em Gestão Ambiental, Universidade Positivo, Curitiba, 2008.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v.58, n.2, p.100-110, 2004.

TEIXEIRA, E. *Acrocomia aculeata* In: TASSARO, H. Frutas no Brasil. São Paulo: Empresa das Artes, 1996, p.15.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Avaliação nutricional da proteína e do óleo do baru (*Dypterix alata* Vog). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.15, n.1, p.66-69, 1995.

TRUEBA, G. P.; SÁNCHEZ, G. M.; GIULIANI, A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Frontiers in Bioscience*, v.9, n.1, p.2029-2044, 2004.

VIEIRA, R. L.; BION, F. M. Valor biológico de dieta a base de soja (*Glycine hispida*) e algaroba (*Prosopis juliflora*). *Boletim do CEPPA*, v.16, n.1, p.58-98, 1998.

VILLELA, I. V. *et al.* Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (orgs.). *Genética Toxicológica*, Alcance, Porto Alegre, 2003 p. 422.

YU, L. W. *et al.* High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans, trans-muconaldehyde. *Anal. Biochem.*, v.156, n.2, p.326-333, 1986.

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial mutagênico/antimutagênico e antioxidante do óleo extraído da polpa da bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.).

Objetivos Específicos

1. Caracterizar o óleo da polpa de bocaiuva quanto ao índice de acidez, índice de peróxido, absorvidade molar, índice de iodo, perfil de ácidos graxos e carotenoides totais.
2. Avaliar, por meio do teste do micronúcleo, a capacidade do óleo da polpa de bocaiuva em induzir danos no material genético de camundongos tratados com o óleo em diferentes concentrações na ração;
3. Determinar o potencial antimutagênico do óleo da polpa de bocaiuva por meio da frequência de micronúcleos em células do sangue periférico de camundongos tratados com o óleo via gavagem;
4. Avaliar o estresse oxidativo por meio da determinação da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
5. Avaliar a atividade antioxidante do óleo pelo método de sequestro do radical hidroxila e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

ARTIGO**Efeito Antimutagênico e Antioxidante do Óleo da Polpa da
Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. em Modelo Murino**

Gleicieli L. A. Costa¹, Simone P. Favaro¹, Susana E. Moreno¹

¹Mestrado em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco – Campo Grande, MS.

Autor para correspondência: *(67) 3312-3468; e-mail: smoreno@ucdb.br

RESUMO

A bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., é uma palmeira nativa do cerrado do Brasil, cujos frutos têm despertado grande interesse científico. O óleo da polpa da bocaiuva é rico em ácido oleico, possuindo também altas porcentagens de β -caroteno e α -tocoferol. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial mutagênico/antimutagênico e antioxidante do óleo extraído da polpa da bocaiuva. A polpa foi obtida de frutos coletados na região de Glória de Dourados, MS. O óleo foi extraído em extrator de Soxhlet com hexano, e o solvente removido por rotaevaporação (40°C). Para avaliação das características do óleo, determinou-se o índice de acidez, índice de peróxido, absortividade molar, índice de iodo, perfil de ácidos graxos e carotenoides totais. Posteriormente, o óleo foi incorporado à ração de camundongos Swiss nas concentrações de 5, 10 e 20%, sendo investigado tanto o efeito mutagênico como antimutagênico, utilizando colchicina como substância indutora de mutações. A atividade antimutagênica do óleo foi também investigada em animais tratados por gavagem (50 μ l/dia durante dez dias). Amostras de soro dos ensaios de investigação antimutagênica foram submetidas à avaliação da peroxidação lipídica, pelo método do tiobarbitúrico (TBARS). A atividade antioxidante *in vitro* do óleo bruto foi avaliada pelo ensaio de atividade sequestradora de radicais hidroxila e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. Nos testes de caracterização, o óleo apresentou boa qualidade, destacando-se o percentual de ácido oleico (71,76%) e concentração de carotenoides totais (694 \pm 8,31 μ g/g). Os resultados com o óleo da *Acrocomia aculeata* evidenciaram ausência de atividade mutagênica e importante efeito protetor do óleo em inibir a formação de micronúcleos. A quantificação de malondialdeído (MDA) em amostras de soro de animais pré-tratados com o óleo evidenciou diminuição nos níveis de lipoperoxidação em todas as concentrações testadas. Em baixas concentrações (5 μ g/ml), o óleo apresentou alta atividade antioxidante (aproximadamente 70%), em ambos os métodos testados. Estes dados sugerem que o óleo da polpa de bocaiuva tem alto potencial nutracêutico, com atividade antioxidante e quimiopreventiva.

PALAVRAS-CHAVES: ácidos graxos monoinsaturados, betacaroteno, genotoxicidade, peroxidação lipídica, radicais livres, teste de micronúcleos.

ABSTRACT

The bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., is a native palm found in Brazilian Cerrado, which fruits have aroused great scientific interest. The bocaiuva pulp oil is rich in oleic acid and also detected high content of β -carotene and α -tocopherol. The aim of this study was to evaluate the mutagenic/antimutagenic and antioxidant potential of the oil extracted from the bocaiuva pulp. The pulp was obtained from fruits collected in the region of Glória de Dourados, state of Mato Grosso do Sul. The oil was extracted by Soxhlet method using hexane, and the solvent was removed by rotary evaporation (40 °C). The value of the acid, peroxide, iodine, the molar absorptivity, fatty acid profile and total carotenoids were measured to analyze the characteristics of the oil. Subsequently, the oil was incorporated into the diet of swiss mice at concentrations of 5, 10 and 20%, being analyzed both mutagenic and antimutagenic effects, using colchicine as the substance to induce mutation. The antimutagenic activity of the oil was also investigated in mice treated by gavage (50 μ l/ day for 10 days). Serum samples of antimutagenicity test were subjected to the evaluation of lipid peroxidation by TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) assay. The *in vitro* antioxidant activity of the oil was assessed by hydroxyl radical scavenging activity assay and the β -carotene/linoleic acid system. In the characterization tests, the oil showed good quality, especially the percentage of oleic acid (71.76%) and total carotenoid concentration (694 \pm 8,31 μ g/g). The results with the oil of *Acrocomia aculeata* showed no mutagenic activity and significant protective effect of the oil, inhibiting the formation of micronuclei. The quantification of malondialdehyde (MDA) in serum samples from animals pre-treated with oil showed a decrease in the levels of lipid peroxidation at all concentrations tested. At low concentrations (5 μ g/ml), the oil showed strong antioxidant activity (approximately 70%), in both methods tested. These data suggest that the bocaiuva pulp oil possesses high nutraceutical potential, with antioxidant and chemopreventive activities.

KEYWORDS: beta-carotene, free radicals, genotoxicity, lipid peroxidation, micronucleus test, monounsaturated fatty acids.

INTRODUÇÃO

A palmeira bociuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., da família Arecaceae, é amplamente encontrada no Cerrado do Brasil, com suas maiores concentrações nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.⁽¹⁾

O aproveitamento da *Acrocomia aculeata* no setor alimentício apresenta um amplo espectro de possibilidades. As comunidades tradicionais utilizam a polpa na forma de farinha para o preparo de sorvetes e produtos de panificação. Suas folhas são utilizadas na nutrição animal. O endocarpo é empregado como carvão ecológico na geração de energia. Ainda, a presença de flavonoides antioxidantes nas folhas abre outra frente de aproveitamento para as folhas. Na polpa são detectadas altas porcentagens de β -caroteno e α -tocoferol, ambos considerados antioxidantes naturais, precursores de vitaminas A e E respectivamente.^{(2) (3) (4)}

Do fruto da bociuva, pode ser explorado tanto a polpa como a amêndoa. O perfil de ácidos graxos do óleo da polpa é composto majoritariamente de monoinsaturados, chegando a apresentar 73% de ácido oleico. Essa quantidade de ácidos graxos monoinsaturados tem despertado o interesse nesse óleo devido a sua semelhança ao azeite de oliva, um importante componente da dieta que auxilia no tratamento de doenças hiperlipidêmicas, cardiovasculares e inflamatórias.^{(5) (6)}

Levando em conta que determinadas espécies vegetais, a exemplo da *Acrocomia aculeata*, apresentam carência de estudos para comprovação da eficácia e segurança dos tratamentos, conhecer suas propriedades mutagênicas constitui importante meio de prevenção do câncer, pois possibilita ao homem evitar o uso de plantas com potencial mutagênico comprovado. Da mesma forma, a identificação de produtos de origem vegetal capazes de impedir mutações celulares mostra-se essencial para que possam ser incorporados em dietas com potencial protetor.

O ensaio *in vivo* do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea de mamíferos roedores é amplamente aceito e recomendado para avaliação e registro de novos compostos químicos e farmacêuticos inseridos no mercado mundial. O ensaio, quando realizado de forma adequada, detecta agentes clastogênicos (que promovem a quebra cromossômica) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou disfunção do fuso mitótico).^{(7) (8)}

Diante desse contexto, esta pesquisa objetivou avaliar o potencial mutagênico/antimutagênico e antioxidante do óleo extraído da polpa da bociuva.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do óleo da polpa da bocaiuva

Os frutos da bocaiuva, maduros, foram coletados na região de Glória de Dourados – MS, durante os meses de outubro a dezembro da safra de 2010. Após a coleta, foram colocados em estufa com circulação de ar a 60 °C para secagem, sendo posteriormente encaminhados para extração da polpa através de processo mecânico em despulpadora. A polpa foi submetida ao extrator de Soxhlet para obtenção do óleo, utilizando hexano como solvente. Após, o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). Essas etapas estão demonstradas na Figura 9 abaixo.

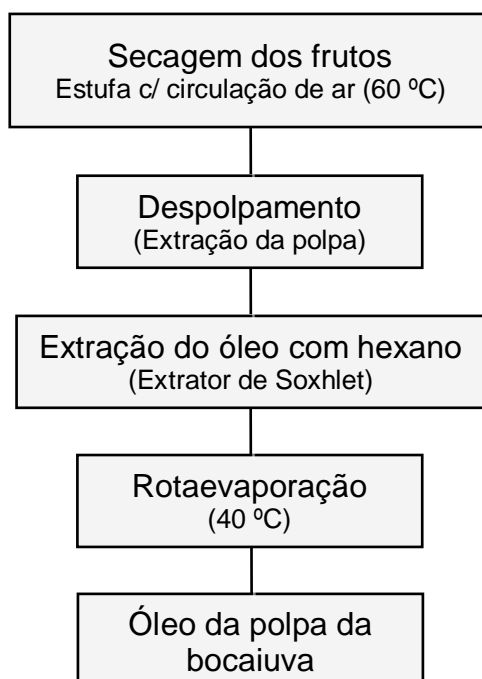


Figura 9 – Fluxograma de obtenção do óleo de bocaiuva.

Caracterização físico-química do óleo

A caracterização foi realizada de acordo com metodologias oficiais da AOCS ⁽⁹⁾ e incluiu o índice de acidez, índice de peróxido, absortividade molar, índice de iodo, análise do perfil de ácidos graxos e quantificação de carotenoides totais.

Índice de acidez: o método consistiu em pesar 0,4 g de óleo em enlermeyer de 25 mL. Adicionou-se 5 mL de solução éter:etanol (2:1). Titulou-se com solução padrão de hidróxido de potássio 0,1 N, na presença de solução alcoólica de fenolftaleína a

1%. Foi preparado um branco da mesma forma que a amostra, porém sem a presença da amostra e foram anotados os volumes gastos de hidróxido de potássio 0,1 mol/L nas titulações da amostra e branco. As análises foram realizadas em triplicata. O índice de acidez foi calculado de acordo com a equação 1.

$$\text{Acidez em ácido oleico (\%)} = \frac{v \times f \times 0,1 \times 28,2}{p} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

v = n° em mL gasto da solução de hidróxido de potássio.

f = fator de correção.

p = peso da amostra.

Índice de peróxido: para a determinação do índice de peróxido, 0,5 g da amostra foi solubilizada em 10 mL de solução de ácido acético/clorofórmio (3:2) e 0,05 mL de solução saturada de iodeto de potássio, deixando em repouso por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 3 mL de água destilada e 0,5 mL de solução indicadora de amido. Titulou-se com tiosulfato 0,01 N sob agitação. Foi preparada uma determinação em branco da mesma forma que a amostra, porém sem a presença da amostra e foram anotados os volumes gastos de tiosulfato de sódio 0,01 mol/L nas titulações da amostra e branco. As análises foram realizadas em triplicata. O índice de peróxido, expresso em miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, foi calculado de acordo com a equação 2.

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{(A-B) \times N \times 1000}{P} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

A = n° de mL de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto na titulação da amostra.

B = n° de mL de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto na titulação do branco.

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio.

P = n° em g da amostra.

Absortividade molar: em um balão volumétrico de 10 mL, pesou-se 0,02 g do óleo e completou-se o volume com isoctano. A leitura das absorbâncias das soluções obtidas foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas de 232 e 270 nm. A absortividade foi calculada de acordo com a equação 3, e os resultados expressos pela média de três repetições.

$$\text{Absortividade molar } (\epsilon) = A / ((P_a \times 10) \times 1) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

A = Absorbância da solução (amostra);

Pa = Peso da amostra.

Perfil de ácidos graxos: realizou-se essa análise em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (modelo 6890N, Agilent Technologie). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME), produzidos com o catalisador trifluoreto de boro (BF_3), foram avaliados sob as seguintes condições: temperatura do injetor de 225 °C; temperatura do detector de 285 °C; temperatura da coluna (HP-88 100m x 0,250mm) de 170 °C inicial por 2 minutos e rampa de 7 °C/min até temperatura final de 210 °C/29 min, razão de split 200:1, fluxo de gás hidrogênio 40 mL/min, fluxo de ar sintético 450 mL/min, fluxo de gás hélio 40 mL/min, volume de injeção 2 µL. A identificação dos principais ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões conhecidos de ácidos graxos metilados (Sigma); e a quantificação, por cálculo das áreas dos picos, sendo os resultados médios expressos em porcentagem.

Índice de iodo: determinado por cálculo diretamente da composição de ácidos graxos insaturados obtidos a partir da análise por cromatografia em fase gasosa. O índice de iodo foi calculado a partir da média dos resultados das equações 4 e 5.

$$\text{Índice de iodo dos triglicerídeos} = (\% \text{ ácido palmitoleico} \times 0,950) + (\% \text{ ácido oleico} \times 0,860) + (\% \text{ ácido linoleico} \times 1,732) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,616) + (\% \text{ ácido gadoleico} \times 0,785) + (\% \text{ ácido erúxico} \times 0,723) \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Índice de iodo dos ácidos graxos livres} = (\% \text{ ácido palmitoleico} \times 0,990) + (\% \text{ ácido oleico} \times 0,8986) + (\% \text{ ácido linoleico} \times 1,810) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,735) + (\% \text{ ácido gadoleico} \times 0,8175) + (\% \text{ ácido erúxico} \times 0,7497) \quad \text{Equação 5}$$

Carotenoides totais: para esta quantificação, pesou-se cerca de 0,02 g da amostra em um balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com éter de petróleo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm, usando éter de petróleo como branco. ⁽¹⁰⁾ O conteúdo de carotenoides foi determinado pela equação 6.

$$C = \text{Abs} \times V \times 10^4 / A_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{amostra (g)} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

C = concentração da amostra.

Abs = absorbância da amostra.

V = volume de diluição da amostra.

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorção do b-caroteno a 450 nm em éter de petróleo (2592).

Ensaio biológicos realizados com o óleo da *Acrocomia aculeata*

Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica

Animais: foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 18-22g, mantidos a temperatura ambiente (23-25°C) e o ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Os protocolos experimentais – Protocolo CEUA/UCDB: 05/2011 – foram conduzidos de acordo com as normas internacionais de ética em pesquisa com animais.

Preparo da ração: foram manipuladas três concentrações de ração, 5, 10 e 20%. As rações foram preparadas à base de ração industrial, que foi moída e misturada ao óleo de bociuiva, adicionando-se água até formar liga homogênea, sendo em seguida distribuídas em formas de alumínio e mantidas em estufa com circulação de ar a 45 °C até a completa secagem.

Teste do micronúcleo

Neste ensaio, os animais foram distribuídos em quatro grupos (n=10):

<i>Grupo controle:</i> tratado com ração padrão, sem óleo incorporado	<i>Grupo 5%:</i> tratado com óleo incorporado na proporção de 5%	<i>Grupo 10%:</i> tratado com óleo incorporado na proporção de 10%	<i>Grupo 20%:</i> tratado com óleo incorporado na proporção de 20%
---	---	--	--

Os grupos experimentais foram submetidos, durante sete dias, ao tratamento com a ração suplementada com óleo de bociuiva. Após, foram separados cinco animais (1 a 5) de cada grupo, que receberam via intraperitoneal a colchicina (0,5 mg/kg), substância considerada mutagênica, carcinogênica e teratogênica, permitindo-se a avaliação do potencial antimutagênico do óleo. Os demais animais (6 a 10) de cada grupo não foram submetidos ao tratamento com colchicina, sendo nestes avaliado apenas o efeito mutagênico do óleo.

Decorrido 24 horas após administrada a colchicina, amostras de sangue foram coletadas e gotejadas sobre lâminas de vidro, nas quais foram realizados os

esfregaços. As lâminas foram deixadas secar por 24 horas à temperatura ambiente e a seguir, fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e coradas com Giemsa por 40 minutos.

A frequência de micronúcleos foi avaliada em 2.000 células por lâmina, em duplicata, em microscópio Nikon Eclipse – 200 com aumento de 1000x. As leituras foram realizadas em teste cego (sem manipulação de dados, de modo a evitar erros de análise).

Teste do micronúcleo – Ensaio com óleo administrado por gavagem

Neste ensaio, para avaliação da atividade antimutagênica, o óleo foi administrado via gavagem. Três grupos de camundongos (n=5) foram pré-tratados, respectivamente com salina, óleo de oliva e óleo de bociuva (50 µl/gavagem) durante dez dias:

<i>Grupo controle:</i> tratado apenas com solução salina (50 µl/gavagem)	<i>Grupo oliva:</i> tratado com óleo de oliva (50 µl/gavagem)	<i>Grupo bociuva:</i> tratado com óleo de bociuva (50 µl/gavagem)
---	--	--

No décimo primeiro dia todos os grupos foram submetidos ao tratamento com colchicina (0,5 mg/kg, via intraperitoneal). Após 24 horas, amostras de sangue foram coletadas para análise da frequência de micronúcleos em eritrócitos, conforme descrito anteriormente.

Avaliação da atividade antioxidante do óleo

Peroxidação lipídica pelo método TBARS

O método TBARS foi aplicado aos grupos de investigação antimutagênica, sendo avaliada a peroxidação lipídica no soro por meio da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Costa.⁽¹¹⁾ Amostras de suspensão celular do sangue (200 µL de soro) foram misturadas com 2 mL de uma solução de ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0,38% (p/v) e ácido clorídrico 0.25 N. A mistura foi aquecida a 100 °C por 30 minutos e, após centrifugação, a absorbância foi medida em 535 nm. A concentração de TBARS foi

calculada a partir da curva padrão do dialdeído malônico ou malondialdeído (MDA) (Figura 10). Os resultados foram expressos em μmoles de MDA/mg de soro.

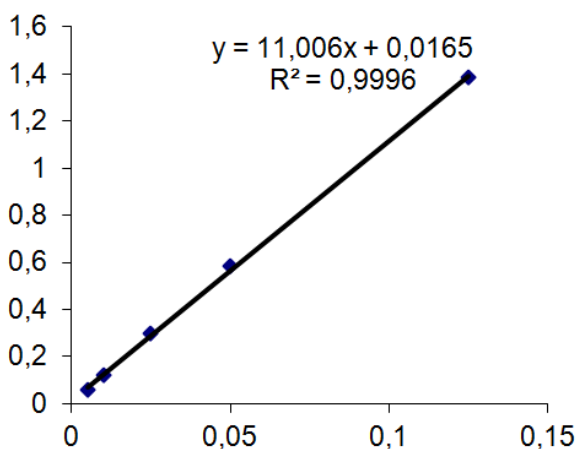


Figura 10 – Curva de Calibração do MDA ($r=0,9996$).

Atividade sequestradora de radicais hidroxila

Para realizar esse ensaio, inicialmente foram preparadas soluções do óleo de bociuva e do padrão ácido ascórbico, em dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol respectivamente, na concentração de $250 \mu\text{g/mL}$ (conservadas em ambiente escuro e à temperatura ambiente). A partir destas soluções foram obtidas diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 125 e $250 \mu\text{g/mL}$), da amostra e do padrão.

Procedeu-se então a realização do ensaio de sequestro de radicais hidroxila. ⁽¹²⁾ A uma alíquota de 1,0 mL da solução contendo o óleo e o padrão foram adicionados 1,0 mL de FeSO_4 (1,5 mM), 0,7 mL de H_2O_2 (6mM) e 0,3 mL de salicilato de sódio (20mM). Os controles foram preparados de acordo com os solventes utilizados. As misturas foram incubadas por 1 hora, à temperatura de 37°C . As absorbâncias de formação do complexo salicilato-hidroxilado foram realizadas em espectrofotômetro a 562 nm.

As análises foram feitas em triplicatas, sendo os percentuais de atividade antioxidante (%AA) das amostras e do padrão calculados conforme a equação 7.

$$\% \text{ Atividade Antioxidante} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

A_{controle} : absorbância da solução tampão fosfato adicionado de H_2O_2 .

A_{amostra} : absorbância da amostra e do padrão com H_2O_2 .

Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

Inicialmente foram preparadas soluções do óleo de bocaiuva e do padrão BHT, em dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Conforme metodologia descrita por Marco,⁽¹³⁾ modificada por Hammerschmidt e Pratt,⁽¹⁴⁾ com algumas adaptações, uma solução de β -caroteno (2 mL), preparada pela dissolução de 2 mg de β -caroteno em 10 mL de clorofórmio (0,2 mg/mL), foi colocada em um balão de fundo redondo, contendo 40 mg de ácido linoleico e 400 mg do emulsificante Tween 20. Após a remoção do clorofórmio, em rotaevaporador a 40 °C, foram adicionados sob agitação vigorosa 100 mL de água destilada saturada com oxigênio. Alíquotas (4,8 mL) dessa emulsão foram transferidas para tubos de ensaios, onde foram adicionados 0,2 mL da solução contendo o óleo. O BHT foi utilizado como controle positivo na mesma concentração, e 0,2 mL de etanol foi utilizado como branco. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 470 nm ($t = 0$), e em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 50 °C, para acelerar as reações de oxidação e iniciar a descoloração do β -caroteno. As análises foram realizadas em triplicata e as absorbâncias foram registradas em intervalos de 20 min ($t = 20, 40, 60$ min). A porcentagem da atividade antioxidante (%AA) foi obtida através da equação 8:

$$\text{AA\%} = [1 - (A_0 - A_t / A_{00} - A_{0t})] \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

A_0 : Absorbância no início do experimento com a amostra a se testar.

A_t : Absorbância no tempo t com a amostra a se testar.

A_{00} : Absorbância no começo dos experimentos sem a amostra a se testar.

A_{0t} : Absorbância no tempo t sem a amostra a se testar.

Análise estatística

Na análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0. A ocorrência de diferença significativa entre os tratamentos foi verificada aplicando-se a análise de variância (ANOVA). Uma vez determinada diferença significativa, aplicou-se o pós teste de Bonferroni ($P < 0,05$) para comparação das médias.

RESULTADOS

Caracterização do óleo

O óleo bruto extraído da polpa da *Acrocomia aculeata* foi caracterizado tanto em função de suas propriedades físico-químicas quanto em relação aos seus constituintes químicos. A Tabela 4 apresenta as propriedades físico-químicas.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas do óleo da polpa da bocaiuva.

Análises	Resultados*
Índice de acidez (% ácido oleico)	2,47 ± 0,06
Índice de peróxido (mEq/kg)	9,28 ± 1,26
Índice de iodo (Wijs)	72,01 ± 2,22
Absortividade 232 nm	2,49 ± 0,07
Absortividade 270 nm	0,64 ± 0,01

*Resultados das análises com média de três repetições (± desvio padrão)

Os índices de acidez e peróxido, tidos como parâmetros na determinação da qualidade em óleos e gorduras, apresentaram valores abaixo do limite máximo permitido para vários óleos vegetais, como o óleo bruto de palma, que é de 5% e 10 mEq/kg respectivamente. ⁽¹⁵⁾ Os valores de absortividade na faixa do ultravioleta, assim como o índice de peróxido, espelham o estado oxidativo do óleo, visto identificarem o acúmulo de compostos primários e secundários resultantes da oxidação. Embora o óleo tenha apresentado índice de peróxido discretamente elevado, os baixos valores de absortividade obtidos demonstram a boa qualidade do óleo.

O perfil de ácidos graxos do óleo extraído da polpa da bocaiuva está apresentado na Tabela 5. Os ácidos graxos encontrados em maior abundância foram o oleico (71,76%) e o palmítico (15,8%), corroborando com outros estudos ⁽⁵⁾ ⁽¹⁶⁾ que relatam ter encontrado no óleo 73% de ácido oleico e 16% de palmítico, valores muito próximos dos encontrados na presente análise.

O teor de carotenoides totais encontrado no óleo foi de 694 ± 8,31 µg/g, determinado pela média de três repetições ± desvio padrão.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos obtidos do óleo da polpa da bocaiuva.

Ácidos Graxos	Proporção em %
Ácido cáprico (C _{10:0})	0,15
Ácido mirístico (C _{14:0})	0,22
Ácido palmítico (C _{16:0})	15,80
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	3,00
Ácido esteárico (C _{18:0})	1,51
Ácido elaídico (C _{18:1})	4,00
Ácido oleico (C _{18:1})	71,76
Ácido linoleico (C _{18:2})	1,79
Ácido linolenico (C _{18:3})	1,01
Ácido Cis-11-eicosênico (C _{20:1})	0,18
Ácidos Saturados	18,00
Ácidos Insaturados	82,00

Teste do Micronúcleo

No ensaio para avaliação do potencial mutagênico do óleo de bocaiuva, não se verificou efeito mutagênico do óleo quando incorporado à ração. Nas concentrações de 5 e 10% de óleo, o número de eritrócitos micronucleados foi similar ao observado em animais que receberam a ração comercial. Por outro lado, os animais que receberam a ração suplementada com 20% de óleo apresentaram redução no número de micronúcleos ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo ração padrão, sugerindo efeito protetor do óleo ao DNA (Figura 11).

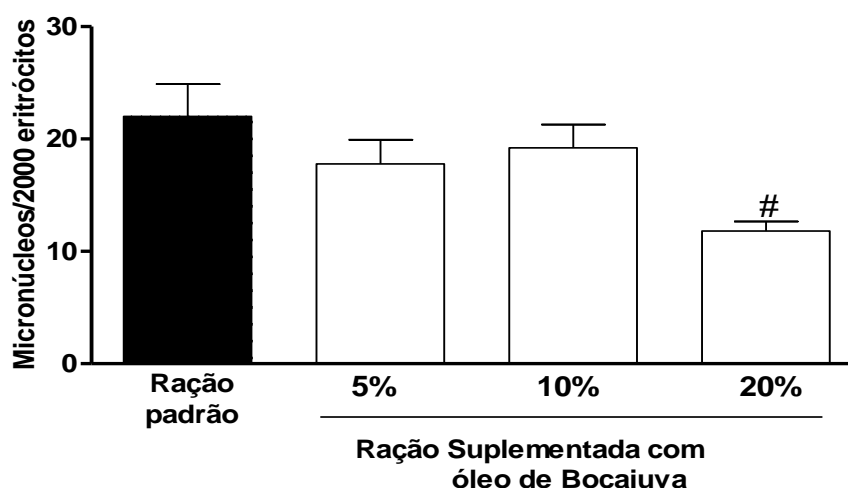


Figura 11 – Avaliação do Efeito Mutagênico do Óleo de Bocaiuva Incorporado à Ração. Para avaliação do efeito mutagênico, os animais receberam ração com incorporação do óleo na proporção de 5%, 10% e 20%, por 7 dias, *ad libitum*. Os animais do grupo controle foram alimentados com dieta padrão. No 8º dia, foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação da frequência de eritrócitos micronucleados. Foram avaliadas 2000 células/camundongo ($n=5$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de micronúcleos. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Objetivando confirmar o potencial antimutagênico do óleo da polpa de bociuiva, animais receberam a ração suplementada e posteriormente foram desafiados com colchicina, um agente mutagênico (Figura 12). Nossos resultados demonstram redução na frequência de micronúcleos nos grupos pré-tratados com óleo de bociuiva nas concentrações de 5% e 20% ($p<0,05$), quando comparado ao grupo que recebeu a ração comercial, o que corrobora o potencial efeito protetor do óleo contra danos induzidos por agentes mutagênicos.

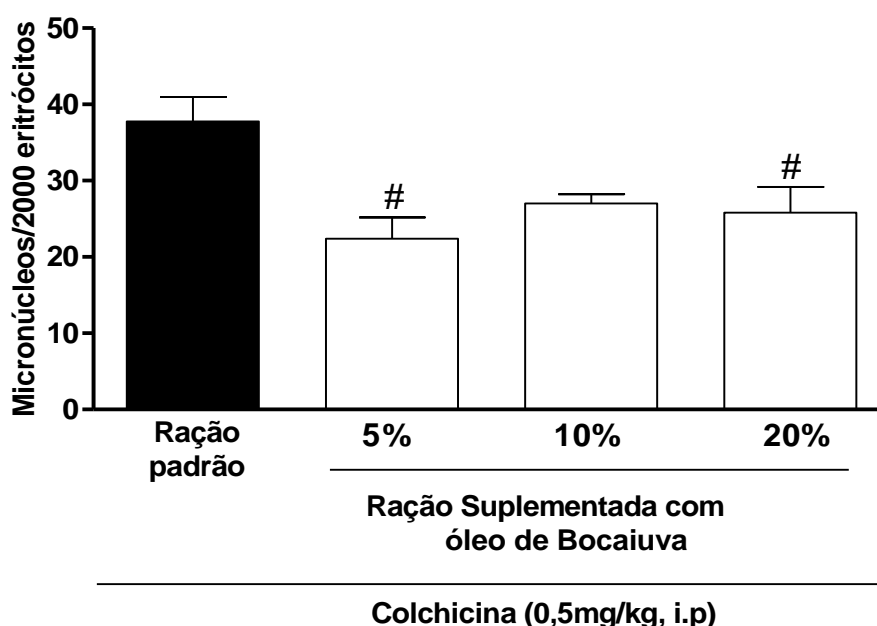


Figura 12 – Efeito Antimutagênico do Óleo de Bociuiva Incorporado à Ração.

Para avaliação do efeito antimutagênico do óleo, os animais receberam ração com incorporação do óleo de bociuiva na proporção de 5%, 10% e 20%, por 7 dias, *ad libitum*. Os animais do grupo controle foram alimentados com dieta padrão. No 8º dia, foram desafiados com colchicina (0,5mg/kg, i.p). Após 24 horas foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação da frequência de eritrócitos micronucleados. Foram avaliadas 2000 células/camundongo ($n=5$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de micronúcleos. # $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle. ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

No ensaio com óleo administrado aos animais por gavagem, nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com o óleo de bociuiva (50 μ l/gavagem) foi capaz de proteger os camundongos contra danos ao DNA induzidos pela colchicina, visto que o número de eritrócitos micronucleados nos animais tratados com o óleo da polpa de bociuiva foi menor ($p<0,05$) quando comparado ao grupo tratado com salina ou azeite de oliva (Figura 13).

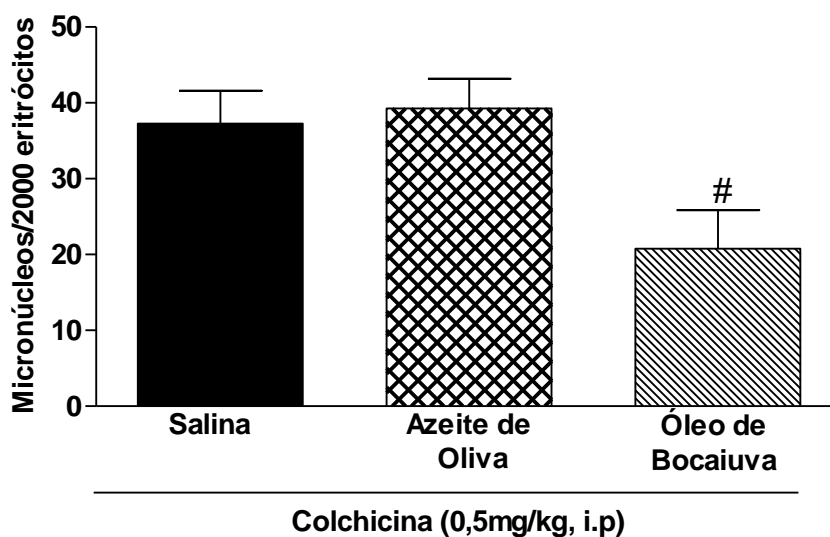


Figura 13 – Efeito Antimutagênico do Óleo de Bocaiuva Administrado por Gavagem. Para avaliação do efeito antimutagênico, os animais receberam 50µl do óleo de bocaiuva ou azeite de oliva por 10 dias. Os animais do grupo controle negativo receberam solução salina no mesmo volume. No 11º dia, os animais foram desafiados com colchicina (0,5mg/kg, i.p). Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação da frequência de eritrócitos micronucleados. Foram avaliadas 2000 células/camundongo (n=5). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de micronúcleos. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Peroxidação lipídica

Uma vez que efeitos genotóxicos e mutagênicos tem sido amplamente associados ao estresse oxidativo, foi avaliada a peroxidação lipídica, considerada um importante marcador do estresse oxidativo e um dos principais fatores envolvidos no dano celular causado pelos radicais livres.⁽¹⁷⁾ A malonaldeído (MDA), marcador mais amplamente utilizado para determinação da peroxidação lipídica, foi quantificada através da equação da curva de calibração ($r=0.9996$).

A quantificação de malondialdeído (MDA) em amostras de soro obtidas de animais tratados via gavagem evidenciou uma diminuição nos níveis de lipoperoxidação para os grupos tratados com óleo de oliva e óleo de bocaiuva, quando comparado ao grupo controle, apresentando $p < 0,05$ (Figuras 14).

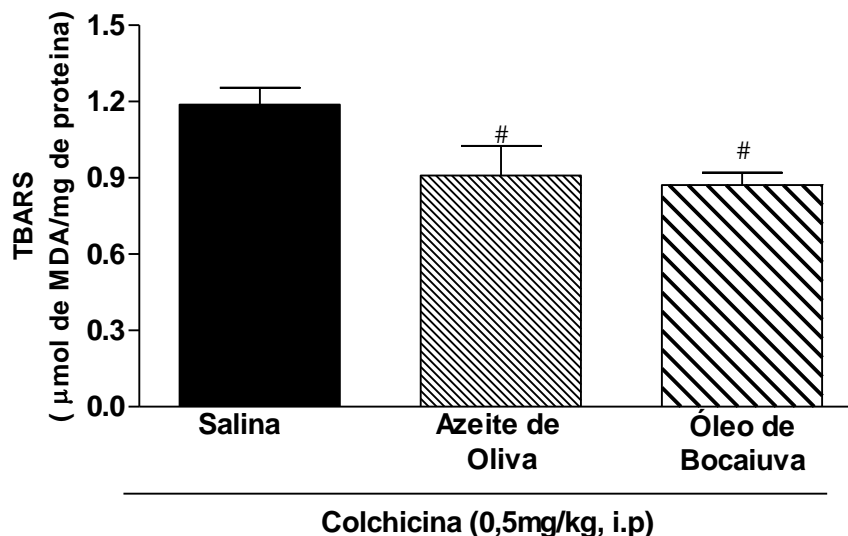


Figura 14 – Peroxidação Lipídica em Células de Animais Tratados com Óleo de Bocauiuva Administrado por Gavagem. Para avaliação da peroxidação lipídica, os animais receberam 50μl do óleo de bocauiuva ou azeite de oliva por 10 dias. Os animais do grupo controle negativo receberam solução salina no mesmo volume. No 11º dia, os animais foram desafiados com colchicina (0,5mg/kg, i.p). Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação peroxidação lipídica por meio da formação de MDA (n=5). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número μmol de MDA/mg de proteína. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

A quantificação de MDA em amostras de soro de animais tratados com óleo de bocauiuva incorporado à ração indicou diminuição nos níveis de lipoperoxidação para todas as concentrações do óleo testadas. O aumento na concentração do óleo da polpa de bocauiuva oferecido aos animais foi inversamente proporcional ao nível de peroxidação lipídica observado (Figura 15).

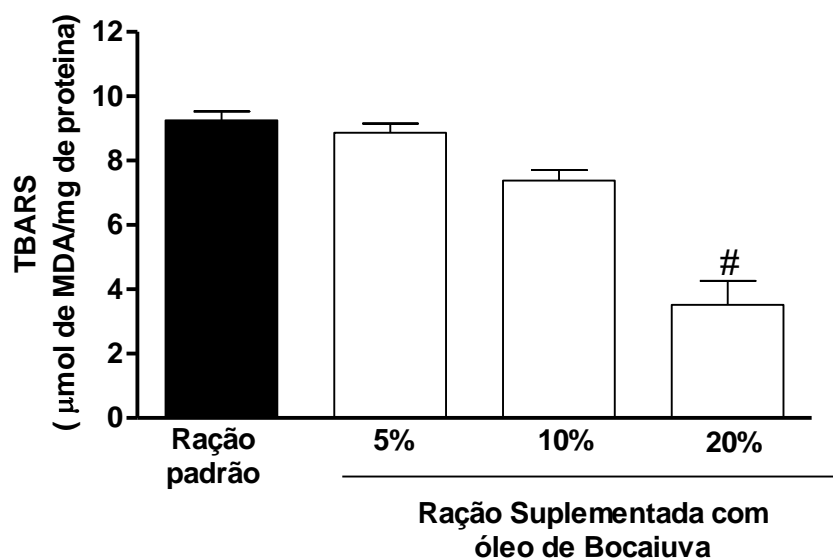


Figura 15 – Peroxidação Lipídica em Células de Animais Alimentados com o Óleo de Bocaiuva Incorporado à Ração. Para avaliação da peroxidação lipídica, os animais receberam ração com incorporação do óleo na proporção de 5%, 10% e 20%, por 7 dias, *ad libitum*. Os animais do grupo controle foram alimentados com dieta padrão. No 8º dia, os animais foram desafiados com colchicina (0,5mg/kg, i.p). Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação da peroxidação lipídica por meio da quantificação da formação de MDA (n=5). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número μ mol de MDA/mg de proteína. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais hidroxila

Buscando compreender um possível mecanismo pelo qual o óleo apresentou efeito antimutagênico e contra a peroxidação lipídica *in vivo*, optou-se por usar o modelo de teste *in vitro* de sequestro de radicais hidroxila, para avaliação do potencial antioxidante do óleo. O método utilizado simula a reação de Fenton, que ocorre no organismo na presença de ferro e peróxido de hidrogênio, gerando o radical hidroxila. ⁽¹⁸⁾

O óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* foi capaz de sequestrar radicais hidroxila formados a partir da reação do peróxido de hidrogênio com sulfato ferroso e salicilato de sódio, diminuindo a formação do complexo hidroxilado de salicilato, sendo esta reação visualizada pela diminuição da intensidade de cor da amostra, como ilustrado na Figura 16.

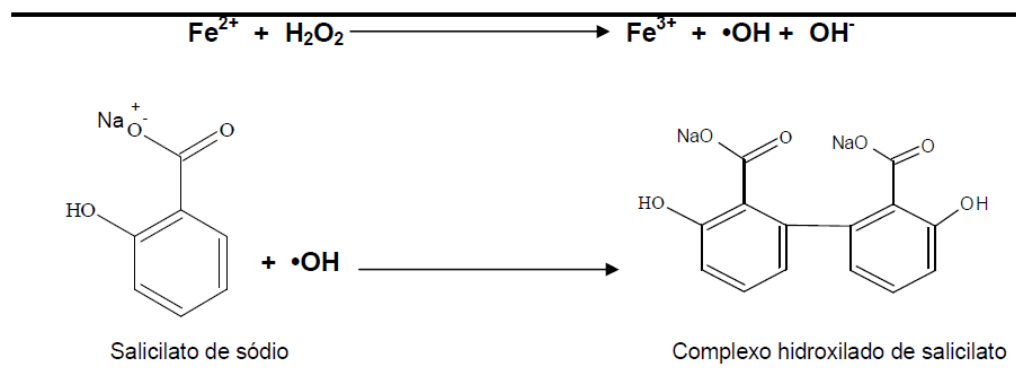


Figura 16: Reação de Formação do Complexo Hidroxilado de Salicilato. ⁽¹⁹⁾

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (% AA) do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* e do controle ácido ascórbico estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Atividade Antioxidante (%) em diferentes concentrações do padrão e do óleo obtida pelo método de varredura do radical hidroxila

	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml
Ácido Ascórbico	83,91±0,42	84,28±0,63	84,19±0,57	83,46±0,16	92,41±0,16	96,34±0,57
Óleo	70,58±0,38	69,47±0,00	67,48±1,15	63,94±0,38	55,53±0,66	41,59±1,79

Atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

O potencial antioxidante do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* foi também determinado pela medida da oxidação associada de β-caroteno e ácido linoleico. Os percentuais de atividade antioxidante no tempo de 60 minutos constam na Tabela 7.

Tabela 7 – Atividade Antioxidante (%) em diferentes concentrações do BHT e do óleo obtida pelo ensaio de oxidação do β-caroteno/ácido linoleico após 60 min.

	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml
BHT	57,85±15,03	66,53±9,91	61,16±19,21	70,25±27,17	72,31±10,51	78,51±21,12
ÓLEO	70,25±14,87	91,74±11,24	66,12±17,37	66,94±5,72	19,01±21,91	2,48±4,54

DISCUSSÃO

O Teste do Micronúcleo foi utilizado como ferramenta de análise do potencial genotóxico do óleo da polpa da bocaiuva. Os micronúcleos são respostas em curto prazo de exposição a uma substância genotóxica, de modo que a sua expressão depende da intensidade da exposição e provavelmente independe da duração de tal exposição.^{(8) (20)}

Através desse teste foi possível investigar eventuais ocorrências de efeitos mutagênicos do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*, constatando-se que a dieta suplementada com esse óleo, nas doses testadas, não foi capaz de induzir aumento na formação de micronúcleos em eritrócitos (Figura 11), ao contrário, exerceu efeito protetor ao DNA.

Diante desses resultados, passou-se a avaliar o potencial antimutagênico do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*. No ensaio de antimutagenicidade, os dados obtidos (Figura 12) revelaram importante efeito protetor do óleo contra danos cromossômicos induzidos pela colchicina, constatado pela redução na formação de micronúcleos em animais pré-tratados com o óleo, demonstrando ação protetora frente ao agente indutor de danos ao DNA.

Na avaliação da atividade antimutagênica do óleo administrado por gavagem, ilustrado na Figura 13, o pré-tratamento com o óleo da *Acrocomia aculeata* resultou significativa diminuição na frequência de eritrócitos micronucleados ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo salina e o grupo tratado com azeite de oliva, confirmando o efeito protetor do óleo.

Vários estudos relatam atividade antimutagênica de óleos vegetais, dentre os quais os azeites de oliva e de canola, que semelhantemente ao óleo da polpa da bocaiuva, apresentam altos teores de ácidos graxos monoinsaturados e compostos antioxidantes.^{(21) (22) (23)}

Estudos prospectivos atribuíram efeito protetor para o ácido oleico na prevenção do câncer de mama, e o aumento do risco desse câncer foi associado à ingestão de ácido linoleico.^{(24) (25)} Importante mencionar que o perfil de ácidos graxos do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* utilizado neste estudo demonstrou a presença de aproximadamente 72% de ácido oleico e apenas 2% de ácido linoleico.

Evangelista⁽²²⁾ verificou efeito anticlastogênico do azeite de oliva e de canola, cujos efeitos foram atribuídos aos compostos antioxidantes presentes, que podem

exercer efeito protetor, agindo como antimutagênico, inibindo danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio.

O óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* apresenta altas concentrações de β -caroteno e α -tocoferol, ambos considerados antioxidantes naturais. No presente estudo, como já demonstrado, foi quantificado $694 \pm 8,31 \mu\text{g/g}$ de carotenoides totais no óleo, mais que o dobro do verificado por Coimbra e Jorge (2011), que evidenciaram no óleo da polpa altos teores de carotenoides totais ($300,01 \pm 2,29 \mu\text{g/g}$) e tocoferóis ($212,95 \pm 0,64 \text{ mg/kg}$), destacando-se as concentrações do α -tocoferol ($143,70 \pm 1,13 \text{ mg/kg}$).

Alguns estudos verificam uma associação entre o estresse oxidativo e o câncer. ^{(26) (27) (28)} A peroxidação lipídica, definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, ao câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. ⁽²⁹⁾ Dano oxidativo ao DNA é considerado o fator mais importante na carcinogênese e evidências sugerem um importante papel de ROS na expansão e progressão de clones de tumor, sendo considerada relevante classe de substâncias cancerígenas. ^{(27) (30) (31)}

Frente ao relatado, mostrou-se importante na presente pesquisa avaliar os níveis de peroxidação lipídica no soro de animais tratados com o óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*, a fim de elucidar um possível mecanismo pelo qual esse óleo foi capaz de proteger danos induzidos pela colchicina, apresentando o efeito antimutagênico. Os resultados obtidos indicaram uma diminuição da lipoperoxidação para todas as concentrações do óleo testadas, observando-se na Figura 15 a ocorrência de um efeito dose-dependente - quanto maior as concentrações, menor os níveis de peroxidação lipídica no soro.

Estudos fornecem evidências que apoiam a hipótese de que carotenoides podem diminuir significativamente os níveis plasmáticos de MDA/TBA e suportam a ideia de que os efeitos benéficos dos carotenoides na dieta podem impedir a peroxidação lipídica nas células. ^{(32) (33) (26)}

O potencial antioxidante do óleo também foi determinado *in vitro* pelo método de sequestro de radicais hidroxilas e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, sendo que em ambos os métodos o óleo demonstrou alto percentual de atividade

antioxidante, quando testado em baixas concentrações, apresentando valores equivalentes ao ácido ascórbico e o BHT utilizados como controle positivo.

A ação antimutagênica do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*, observada *in vivo*, pode ser resultante da atividade antioxidante do óleo evidenciada tanto *in vivo* quanto *in vitro* no presente estudo. Existem relatos de que a interação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio com as bases do DNA pode resultar na formação de aductos de DNA, que durante o curso de tentativa de reparo ou replicação, pode levar a mutações no DNA. ^{(28) (30)}

A investigação da inter-relação entre os radicais livres e antioxidantes da dieta é um campo de grande interesse para a elucidação dos mecanismos da carcinogênese. ⁽⁶⁾ Pesquisas têm demonstrado que a suplementação da dieta com vitamina C, α -tocoferol, e β -caroteno protege o DNA contra danos oxidativos. Esses resultados suportam a hipótese de que produtos vegetais contendo carotenoides exercem um efeito protetor sobre o câncer através de uma diminuição no dano oxidativo ao DNA em seres humanos. ^{(34) (35)}

Corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa, estudo desenvolvido por Umegaki ⁽³⁶⁾ demonstrou, a partir da cultura de linfócitos humanos irradiados com doses baixas de Raios-X, uma diminuição na formação de micronúcleos no grupo tratado com β -caroteno. Isso reforça a hipótese de que o efeito antimutagênico observado no óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* pode estar associado ao alto teor de carotenoides totais encontrados.

Apesar dos diversos estudos sobre avaliação do potencial antimutagênico de extratos vegetais, os mecanismos da antimutagenicidade ainda não estão completamente elucidados, sendo difícil especular sobre a natureza dos componentes químicos responsáveis pela ação antimutagênica. Estudos sugerem que esta ação antimutagênica pode ser resultante da atividade antioxidante ou da interferência de um ou mais compostos ativos nas vias metabólicas, onde os agentes mutagênicos atuam. ^{(22) (37) (38) (39)}

A partir dos resultados obtidos na avaliação da atividade antimutagênica, testada com doses fixas em camundongos tratados via gavagem, é possível sugerir a viabilidade de emprego do óleo da polpa de bociuva em futuros fármacos a serem desenvolvidos pela indústria farmacêutica. Já o efeito antimutagênico observado em tratamentos com o óleo incorporado à ração evidencia que esse óleo

pode ser agregado à dieta, apresentando alto potencial nutracêutico, com atividade antioxidante e quimiopreventiva.

Em síntese, os testes realizados no óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* revelaram ausência de atividade mutagênica, assim como importante potencial antimutagênico do óleo, demonstrando ainda eficácia na inibição ou sequestro de radicais livres, sugerindo uma provável ação antioxidante do óleo, efeitos que podem estar associados com a presença de importantes componentes com histórico de proteção ao DNA.

REFERÊNCIAS

1. Henderson A, Galeano G, Bernal R. Field guide to the palms of the americas. Princeton University Press, Princeton, 1995, pp. 166-167.
2. Lorenzi GM. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
3. Ramos MI, Ramos Filho MM, Hiane PA, Braga Neto JA, Siqueira EM. Qualidade nutricional da polpa de bociuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciênc Tecnol Aliment* 2008;28:90-94.
4. Coimbra MC, Jorge N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. *Food Research International* 2011;44:2139-2142.
5. Hiane PA, Ramos MI, Filho MM, Pereira JG. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do Estado de Mato Grosso do Sul. *Boletim do CEPPA* 1992;10:35-42.
6. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer Prev* 2000;36:1235-1247.
7. Choy WN. Regulatory genetic toxicology tests. In: *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. (Choy WN, ed.). Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 93-113.
8. Ribeiro LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: *Mutagênese Ambiental* (Ribeiro LR, Salvadori DM, Marques EK, Eds.) ULBRA, Canoas, 2003, pp.173-200.
9. AOCS - American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, Champaign, 1993.
10. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. IFPRI, Washington, 2004, pp. 2-51.
11. Costa CM, Santos RC, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:345-350.
12. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 1989;28:1057-1060.
13. Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1968;45:594-598.

14. Hammerschmidt PA, Pratt DE. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J Food Sci* 1978;43:556-559.
15. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Diário Oficial da União, Brasília, publicada em 20 de junho de 2000, n. 3029.
16. Hiane PA, Penteado MV, Badolato E. Teores de ácidos graxos e composição centesimal do fruto e da farinha da bocaiuva (*Acrocomia mokayáya* Barb. Rodr.). *Alim Nutr* 1990;2:21-26.
17. Balu M, Sangeetha P, Haripriya D, Panneerselvam C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci Lett* 2005;383:295-300.
18. Barreiros AL, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova* 2006;29:113-123.
19. Arruda AL. Contribuição ao estudo de atividade biológica de jacaranda cuspidifolia mart. (Bignoniaceae). Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
20. Krishna G, Hayashi M. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 2000;455:155-166.
21. Anter J, Campos-Sánchez J, Hamss RE, Rojas-Molina M, Muñoz-Serrano A, Analla M, Alonso-Moraga A. Modulation of genotoxicity by extravirgin olive oil and some of its distinctive components assessed by use of the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research* 2010;703:137-142.
22. Evangelista CM, Antunes LM, Francescato HD, Bianchi ML. Effects of the olive, extra virgin olive and canola oils on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2004;42:1291-1297.
23. Owen RW, Haubner R, Würtele G, Hull E, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:319-326.
24. Wolk A, Bergström R, Hunter D, Willett W, Ljung H, Holmberg L, Bergkvist L, Bruce A, Adami HO. A prospective study of association of monounsaturated fat and other types of fat with risk of breast cancer. *Arch Intern Med* 1998;158:41-45.
25. Velie E, Kulldorff M, Schairer C, Block G, Albanes D, Schatzkin A. Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer in postmenopausal women: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:833-839.
26. Russell RM. The enigma of β -carotene in carcinogenesis: what can be learned from animal studies. *J Nutr* 2004;134:262-268.

27. Trueba GP, Sánchez GM, Giuliani A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in câncer. *Front Biosci* 2004;9:2029-2044.
28. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996;313:17-29.
29. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol* 1989;26:277-285.
30. Cook MS, Evans MD. Reactive oxygen species: from DNA damage to disease. *Science & Medicine* 2005;10:98-110.
31. Box HC, O'Connor RJ, Patrzyc HB, Iijima H, Dawidzik JB, Freund HG, Budzinski EE, Cummings KM, Mahoney MC. Reduction in oxidatively generated DNA damage following smoking cessation. *Tob Induc Dis* 2011;9:1-7.
32. Dixon ZR, Shie FS, Warden BA, Burri BJ, Neidlinger TR. The effect of a low carotenoid diet on malondialdehyde-thiobarbituric acid (MDA-TBA) concentrations in women: a placebo-controlled double-blind study. *J Am Coll Nutr* 1998;17:54-58.
33. Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 1999;70:475-490.
34. Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996;56:1291-1295.
35. Pool-Zobel BL, Bub A, Müller H, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 1997;18:1847-1850.
36. Umegaki K, Ikegami S, Inoue K, Ichikawa T, Kobayashi S, Soeno N, Tomabechi K. Beta-carotene prevents x-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1994;59:409-412.
37. Knasmüller S, Steinkellner H, Majer BJ, Nobis EC, Scharf G, Kassie F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1051-1062.
38. Resende FA, Alves JM, Munari CC, Senedese JM, Sousa JP, Bastos JK, Tavares DC. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutat Res* 2007;634:112-118.
39. Vinod V, Tiwari PK, Meshram GP. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the in vitro Ames Salmonella/microsome assay and in vivo mouse bone marrow micronucleus test. *J Ethnopharmacol* 2011;134:931-937.

ANEXO I - Normas da Revista para Publicação

Journal of Medicinal Food

Manuscript Submission

Please upload manuscripts using the following URLs:

Authors from North and South America, Europe, and Africa should submit at:
<http://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood>

Authors from Asia and Oceania (including Australia) should submit at:
<http://mc.manuscriptcentral.com/jmfkorea>

Manuscripts submitted to Journal of Medicinal Food may not be under consideration for publication elsewhere. All submissions will be acknowledged.

Full Communications should be presented in the standard format described below, and should not exceed 3,000 words (excluding references, tables, figures, legends, acknowledgements, and disclosures).

Short Communications are intended for the presentation of brief observations that do not warrant a full-length text, but also are not preliminary results. Word limit is 1,500. Include an abstract; do not use section headings in the body of the text; report methods, results, and discussion in a single section. Citations are identical in style to those of full-length articles, but appropriately abbreviated in number.

Technical Notes are brief scientific observations and methods (preparative, analytical, etc.).

Letters to the Editor can be on any issue relevant to the field. They must be brief (one or two journal pages) and appropriately documented by data. Letters may be addressed to the Editor-in Chief or Associate Editors, and may be subject to review.

Reviews and Perspectives may be solicited by the Editors or submitted independently. Reviews are summaries of developments in medicinal food and nutrition. Perspectives are more representative of an opinion about an area of the field or a direction of research. Both may be subject to peer-review. Reviews and Perspectives should not exceed 4,000 words (excluding references, tables, figures, legends, acknowledgments, and disclosures.)

Conference Proceedings: Authors wishing to submit conference/workshop summaries should contact the editorial office well in advance of the event to discuss publication potential and obtain guidance on preparation.

Manuscript Submission and Copyright Agreement Form

The Copyright Agreement form (available at www.liebertpub.com/media/content/transfer_of_copyright.pdf) should be submitted once your article has been accepted for publication. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Upon acceptance of your article, please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2108.

IMPORTANT:

Please do NOT upload a single PDF file containing all text, image, and table files. Upload individual files of all manuscript material. Once all individual files are uploaded on to Manuscript Central, the system will automatically create a single PDF proof for you and for the peer-review process.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Prepare the entire manuscript, including figure legends, in Microsoft Word. The manuscript should be double spaced (6mm minimum), with ample margins (minimum 1") on all sides.

The title page should include the authors' names and affiliations, a running title of about 45 characters (including spaces), and the full contact information for the corresponding author (i.e., mailing and/or street address, telephone and fax numbers, and E-mail address.) The second page must consist of an abstract of not more than 250 words, which should be self-explanatory without reference to the text. The SI system should be used for all scientific and laboratory data. Full communications are structured using the following headings: abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, and references. Number pages consecutively. At the end of the manuscript, give the name, mailing address, and E-mail of the individual to whom correspondence should be directed.

The authors may suggest suitable referees during the submission process, but must provide accurate E-mail addresses for all such individuals.

Key Words. Three to 10 key words or phrases must be provided after the abstract to facilitate computer searches. Key words should not repeat words or phrases used in the title. They should be listed alphabetically.

Acknowledgments. Collaborations, sources of research funds, and other acknowledgments should be listed in a separate section at the end of the text ahead of the REFERENCES section.

Disclosure Statement. Immediately following the Acknowledgments section, include a section entitled "Author Disclosure Statement." In this portion of the manuscript, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are

actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the manuscript is being reviewed and will not influence the editorial decision. Please see the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org/index.html#conflicts for further guidance. If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research: Protection of Human Subjects and Animals in Research*

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed.

*This portion of *Journal of Medicinal Food's* Instructions for Authors has been quoted directly from the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals website. For more information, visit www.icmje.org/ethical_6protection.html

References. Cite all references within the text by a superscript Arabic number. Number references in the order that they appear in the text. Double-space the references and triple-space between each listing. When there are more than six authors, it is acceptable to list the first three followed by "*et al.*", but this must be applied consistently throughout the reference section. Use the following styles as appropriate:

Journals: (1) surname of author(s), initials, (2) article title, (3) journal, (4) year of publication, (5) volume number, and (6) first and last page of citation.

Journal Example:

Lappé MA, Bailey EB, Childress C, Setchell KDR: Alterations in clinically important phytoestrogens in genetically modified, herbicide-tolerant soybeans. *J Med Food* 1999;1:241–245.

Books: (1) surname of author(s), initials, (2) chapter title, (3) title of book, (4) editors of book (if applicable), (5) edition of book (if applicable), (6) publisher, (7) city of publication, (8) year of publication, and (9) first and last page reference.

Book example:

Karp A: On the current understanding of somaclonal variation. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, Vol. 2. (Mifflin BJ, ed.) Oxford University Press, Oxford, 1990, pp. 199–234.

Patents: (1) surname(s) of author(s), initials, (2) patent title, (3) country where patent issued, (4) patent number, (5) month, day, and year of issuance.

Patent Example:

Hendler SS, Sanchez R: Tocopherol-based antiviral agents and method of using same. U.S. Patent 5,114,957. May 19, 1992.

Online Journals: Online journals are cited using the same format as print journals. Add "(Online)" after the journal name. Include inclusive pagination or other identifying information such as DOI (Digital Object Identifier) number.

Online Journal Example:

Faller P, Goussias C, Rutherford AW, Un S: Resolving intermediates in biological proton-coupled electron transfer: A tyrosyl radical prior to proton movement. *Proc Natl Acad Sci USA* (Online) published July 10, 2003, 10.1073/pnas 1530926100.

URL (Web Page): (1) Author, if available. (2) Title of page as listed on the site. (3) Address of page. (4) Date accessed.

URL (Web Page) Example:

Hsu, D: Chemicool Periodic Table. www.chemicool.com (accessed Jan 1999).

Unpublished References: When data from an unpublished source are presented, supply complete information, e.g., researcher's name and location. If work is in press, give the journal in which it is to be published or the publisher. Include "In press" in place of publication date.

Tables. Type each table with its title in a separate file. Use Arabic numerals to number tables. Each table must stand alone (i.e., contain all necessary information in the caption) and the table itself must be understood independently of the text. Details of experimental conditions should be included in the table footnotes. Table legends and footnotes should be double-spaced. Information that appears in the text should not be repeated in tables, and tables should not contain data that can be given in the text in one or two sentences.

Illustrations. Prepare a separate list of figure legends, double-spaced, at the end of the manuscript. Magnifications should be included when appropriate.

Color publication of figures is encouraged, but the cost for color printing must be subsidized by the author(s). Authors will be charged at the rate of \$800.00 USD for **each printed page** that includes color. Please consider these costs when preparing your manuscript for submission.

Alternatively, figures may be published in color in the online version of the journal, and black and white in the print version, with no additional publication charges.

Please follow these guidelines for submitting figures:

- Do **NOT** embed art files into a Word or PDF document.
- Line illustrations should be submitted at 900 dpi.

- Halftones and color should be submitted at a minimum of 300 dpi.
- Save as either TIFF or EPS files.
- Color art must be saved as CYMK—**not RGB**.
- Black and White art must be submitted as grayscale—**not RGB**.
- Do **NOT** submit PowerPoint, PDF, Bitmap, or Excel files.

Please name your artwork files with the submitting authors name i.e. SmithFig1.tif, SmithTable2.tif etc. **Authors who do not follow these guidelines may have their submission returned to them without being reviewed.**

Converting Word or Excel files: Perhaps the best and easiest way to **convert Word or Excel files** into a format which is suitable for print is to scan them using the below guidelines:

- All files should be scanned at 100% size.
- 300 dpi
- Final color mode: cmyk
- save file as: .tif or .eps

If you need directions on how to **convert a PowerPoint slide** to acceptable format go to www.liebertpub.com/MEDIA/pdf/ppconvert.pdf

Permissions

The author must obtain permission to reproduce figures, tables, and text from previously published material. Written permission must be obtained from the original copyright holder (generally the publisher, not the author or editor) of the journal or book concerned. An appropriate credit line should be included in the figure legend or table footnote, and full publication information should be included in the reference list. Written permission must be obtained from the author of any unpublished material cited from other laboratories, and should accompany the manuscript. All permissions listings must be shown in manuscript—they cannot be entered on proofs.

FEES AND REPRINTS

To help defray the cost of printing, the publisher requests that charges of \$80 per printed page be paid by all authors who have funds available from research grants or from their institutions. (Editorial Board members will be charged a special price of \$55 per printed page.) However, the ability to pay page charges is not a prerequisite for publication.

Reprints may be ordered by following the special instructions that will accompany page proofs, and should be ordered at the time the corresponding author returns the corrected page proofs to the Publisher. Reprints ordered after an issue is printed will be charged at a substantially higher rate.

Publisher

The Journal is published by Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 140 Huguenot Street, 3rd Floor, New Rochelle, NY 10801-5215. Telephone: (914) 740-2100, Fax: (914) 740-2108, E-mail: info@liebertpub.com